

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; AKIJI FUJITA, Tokyo; KIKO GOTO, Kyoto; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; SHIGEO SUZUKI, Kagoshima; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Sendai; TOYOO UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

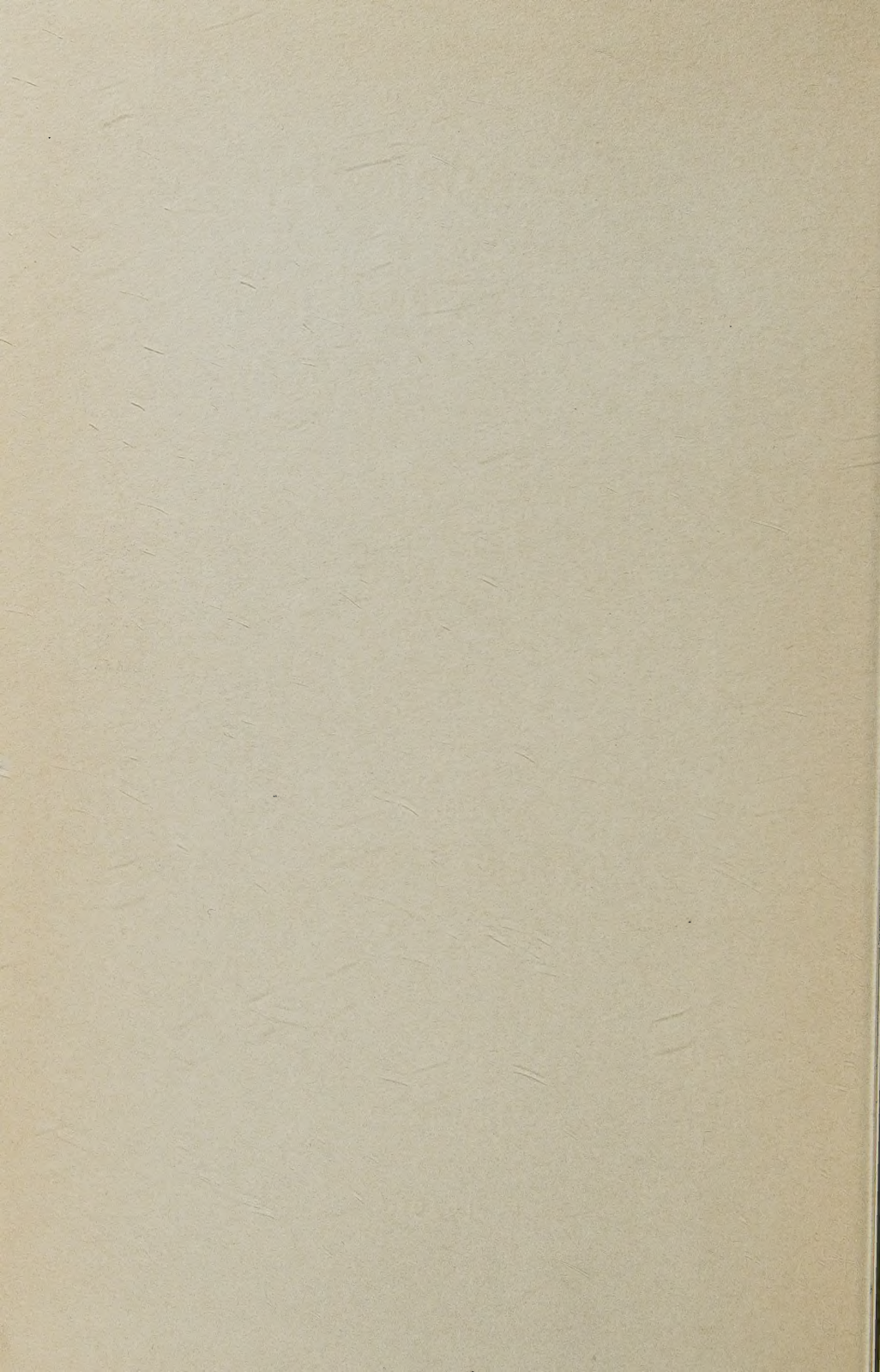
Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME 30

TOKYO

1939

QP
501
J67



THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; AKIJI FUJITA, Tokyo; KIKO GOTO, Kyoto; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; SHIGEO SUZUKI, Kagoshima; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Sendai; TOYOO UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME 30

TOKYO

1939

COPYRIGHT 1939

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

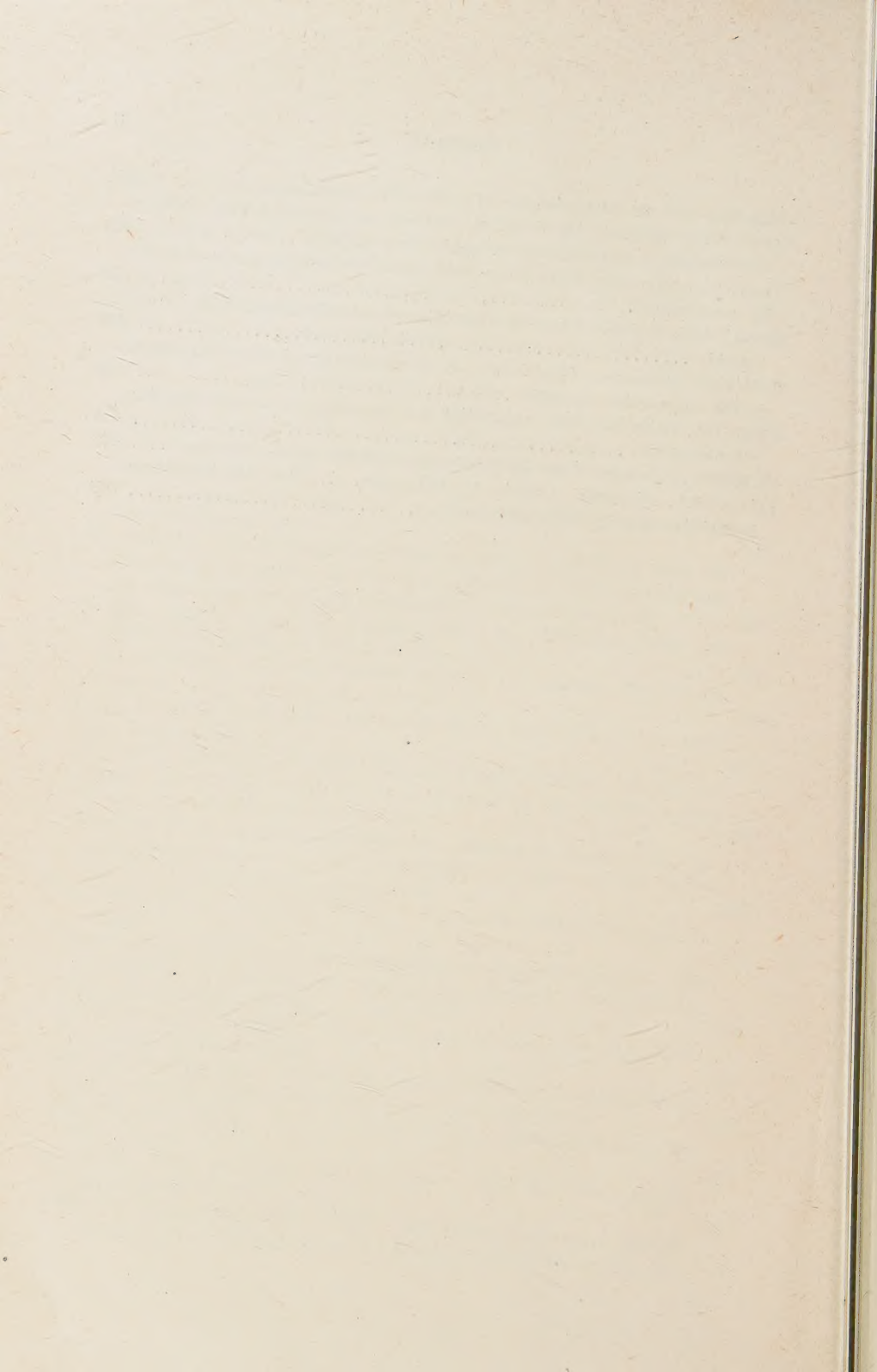
PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS TO VOLUME 30.

	Page
BEARD, Howard H. The chemical nature of an aqueous extract of the suprarenal cortex of sheep	1
TANABE, Yasuhisa. Biochemical studies on carbohydrates. XLV. "Sublingual mucoid" and an artificial saliva mucin	11
SUZUKI, Masami. Biochemical studies on carbohydrates. XLVI. Mucin from umbilical cord	19
XLVII. Polysaccharides from umbilical cord	23
YOSHITAKE, Masato. Biochemical studies on carbohydrates. XLVIII. An estimation of free blood-sugar in the co-presence of aminosugar	29
KAMEGAI, Satoru. Über das Kupfer im Organismus, beobachtet vom Standpoint seines phylogenetischen, ontogenetischen und geschlechtlichen Unterschiede aus.	
III. Mitteilung: Die ontogenetischen Untersuchung von Kupfer und Eisen im Blut der Hühnerembryonen	33
IV. Mitteilung: Das Verhältnis von Kupfer und Eisen im Pflanzen- gewebe	45
SABA, George. Isolation of choleic acid from dog bile	55
SABA, George. Determination of dehydrocholic acid	61
FUJITA, Hiroshi. Über die Mikrobestimmung der Blutphosphatase....	69
AIZAWA, Katsuse. Studien über Carbohydrase. I. Die fermentative Hydrolyse der <i>p</i> -Nitrophenol-glukoside	89
TOMITA, Masaji und Yoshinori SEIKI. Über die Stereoisomerie der γ -Amino- β -oxy-buttersäure	101
SEIKI, Yoshinori. Über die Stereoisomerie des Iosserine	107
ISEKI, Toshinori und Tsukouru SUGIURA. Synthese eines hochmolekularen Oxymethylfurfurollderivates	113
ISEKI, Toshinori und Tsukouru SUGIURA. Zur Kenntnis der Zucker- Aminosäure-Verbindungen	119
FUKUDA, Shinogu. Beiträge zur Embryochemie der Schlangen	125
FUKUDA, Shinogu. Über die chemischen Bestandteile des Schneckeneies	135
FUKUDA, Shinogu. Über die N-haltigen Extraktivstoffe, besonders die organischen Basen der Bauchspeicheldrüse	141
MICHIMOTO, Hidetane. Über das Kephalin bei der Blutgerinnung	147
SUEYOSHI, Yuji und Hidetane MICHIMOTO. Über den Gehalt der Gewebe an hochgesättigtem Kephalin bei der C-Avitaminose	155
HARA, Takiwo. Über den Einfluss der Eiweissfettdiät auf die Hippur- säuresynthese	159
TANABE, Yasuhisa. Biochemical studies on carbohydrates. XLIX. Sub- maxillary mucin and mucoid	181
SUZUKI, Masami. Biochemical studies on carbohydrates. L. Prosthetic	

group of corneamucoid	185
LI. Carbohydrate grouping of the mucin from the vitreous humor	193
YOSITAKE, Masato. Biochemical studies on carbohydrates. LII. Estimation of free aminosugar in urines, normal and diabetic	199
KURIHARA, Zenya. Eine Mikrobestimmungsmethode des Histidins	205
IRI, Sadaya. On the mechanism of the action of hexokinase	217
NAGAI, Junji. The relationship between oxidoreduction and tryptic and creptic activities	225
NAGAI, Junji and Takaaki ITO. On the chemical study of fugu (Spheroides) poison. I. Nitrogen distribution in the purified poison ..	235
YAMASAKI, Kazumi, Kumao TAKAHASHI u. Chai Heung KIM. Über die Isodioxycholsäure. Notiz über die Spezifität der Hammarstensen Reaktion der Cholsäure	239
KIM, Chai Heung. Über die Gallensäure von Schildkrötengalle; Trioxy-sterocholansäurelaktone	247
RI, Kokusho. On the influence of various kinds of nutrition upon the acetaldehyde formation in the liver. Report 1. The acetaldehyde formation in the liver of dog nourished by a normal mixed diet	251
KAIJU, Masaru. Über die Leberarginase. II. Mitteilung. Über die Arginasewirkung bei der Leberautolyse	265
III. Mitteilung. Über die Arginasewirkung auf Acetyl- <i>l</i> -phenylalanyl- <i>d</i> -arginin	271
ITOH, Ryoji und Fujio OBO. Effects of reduction and oxidation on yeast-saccharase action	277
ITO, Ryoji, Shinkichi KAYASHIMA and Kinsei FUJIMI. Studies on lipase. VI. Effects of reduction and oxidation on the splitting action of serum-lipase and milk-esterase	283
ITOH, Ryoji and Sinkichi KAYASHIMA. Studies on lipase. VII. An alkali-titrating method for the determination of tissue esterase action and the results obtained by this method	291
MIYAZI, Shigeki und Hideo ISAKA. Über α - u. β -3-keto-7-Oxycholsäure	297
AKAO, Akira. Beiträge zur Wachstumphänomen des Seidenspinners. Die verschiedenen aufbauenden und katalytischen Elemente und deren biologische Bedeutung während des Wachstums	303
OHNO, Korenori. Studies on the behaviours of glycogen and lipids under various nutritional states	351
TUKAMOTO, Morihisa. Über das Schicksal der 3,6-Diketoallocholansäure und der β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure im Krötenorganismus	377
MATSUKAWA, Danji. Über die kolorimetrische Mikrobestimmung des Formaldehyds	385
NUMATA, Isamu und Danji MATSUKAWA. Über die kolorimetrische Mikrobestimmung des Kupfers	395
YASUDA, Morio and Korenori OHNO. The simultaneous micro determination of various fractions of lipids (phospholipid, cholesterol and fat),	

together with the determination of their iodine numbers	401
YOSITAKE, Masato. Biochemical studies on carbohydrates. LIII.	
Glucosamine as a glycogenetic substance in organisms	423
LIV. Hyperglycemia after glucosamine injection and the mechanism of its occurrence	439
KOBAYASI, Tadasi. Biochemical studies on carbohydrates. LV. Urine mucoid	451
TÁWARA, Motomasa (The late). A photoreducing substance contained in the commercial candiolin	459
FUKUDA, Shinogu. Eine qualitative und quantitative Bestimmung der Pikrolonsäure	465
FUKUDA, Shinogu. Über die Drehungssteigerung der <i>d</i> -Milchsäure	473
IMAMURA, Hiroyuki. Chemie der Schlangen. I. Über die N-haltigen Extraktivstoffe der Schlangemuskeln	479



THE CHEMICAL NATURE OF AN AQUEOUS EXTRACT OF THE SUPRARENAL CORTEX OF SHEEP^{1, 2}.

By

HOWARD H. BEARD.

(From the Department of Biochemistry, Louisiana State University Medical Center, New Orleans, and the Harriman Research Laboratory, Southern Pacific General Hospital, San Francisco.)

(Received for publication December 16, 1938)

Recent research has shown that the adrenal cortex contains substances which are of the utmost importance in the physiological economy of the animal body. Most important of these are ascorbic acid (Vitamin C) and its relation to scurvy, resistance to infection, nutrition of the bones and teeth, and to the oxidation-reduction processes in the body; cortin, a hormone believed to be essential to life, and its relation to Addison's disease and to carbohydrate, sodium, and potassium metabolism; and the Coffey-Humber active principle, supracorsin, and its relation to tissue metabolism and its effectiveness in the treatment of human malignancy, peptic ulcer, asthmatic conditions and surgical shock.

Coffey and Humber (1930) published their method of preparing an aqueous extract, named supracorsin, from the cortex of the adrenal glands of sheep. The glands are obtained at the slaughter house, defatted, the medulla removed by dissection, and the cortical tissue ground and placed under 2½ volumes of water. The whole is then heated for various lengths of time at different

1. Several preliminary reports of the progress of these studies for the last 6 years have been made as follows: Before the Biochemical Section of the American Chemical Society, World's Fair, Chicago, Ill., Sept. 8, 1933; before the 32nd and 35th Annual Meetings of the Pacific Association of Railway Surgeons at San Francisco, Sept. 7, 1934, Reno, Sept. 5, 1936, and Guadalajara, Jalisco, Mexico, October 9, 1937, respectively.

2. This work was done in San Francisco during summer vacations of the writer.

temperature. After cooling, the solid material is removed, the solution made acid with dilute HCl, and, after filtering 2½ volume of alcohol are added to the filtrate. After standing in the ice chest overnight, the alcohol is decanted from the precipitate (Proteose A, Precipitate I), and the alcohol is removed by distillation *in vacuo*. The solution is then further concentrated to a definite volume, sterilized, and preserved for clinical use.

During the summer of 1932, the writer was invited by the California Surgeons to make a study of the chemical nature of their extract. On account of the very small amount of nitrogenous material found to be present large amounts of the extract were used in later attempts at fractionation. This is our final report on this work and this paper will contain a description of the isolation of amino acid nitrogen in the peptone fraction of the extract.

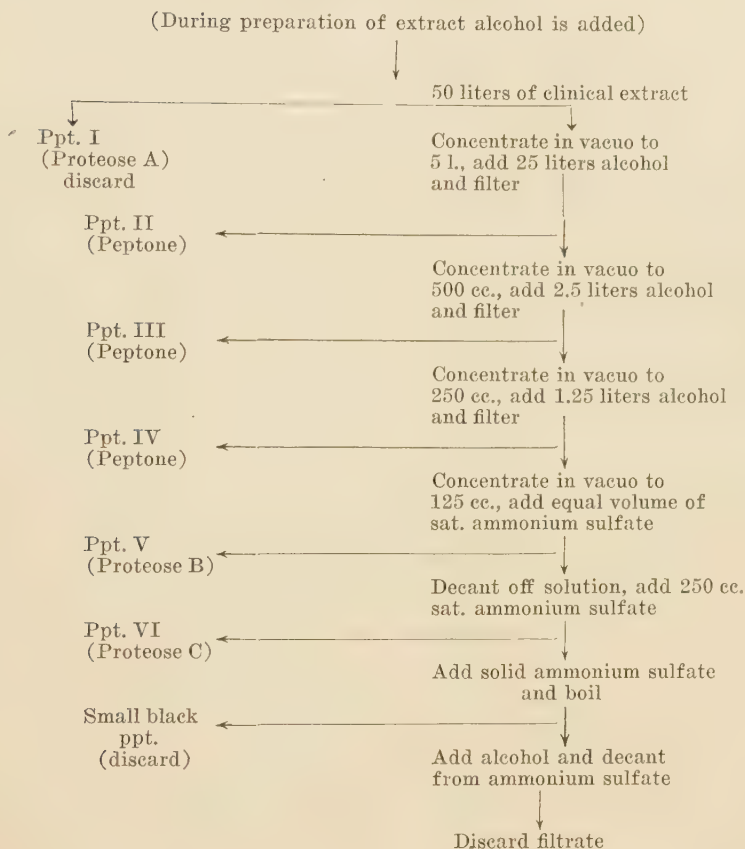
EXPERIMENTAL.

The following alcoholic fractionation, using from 10 to 50 liters of clinical extract each time, was carried out on three different occasions, only the last of which will be discussed here.

Fifty liters of the clinical extract, representing 20 kg. of fresh cortical tissue, were concentrated under reduced pressure to 5 liters. Aliquots of 700 cc. of this were dropped into 3.0 liters of 95 per cent alcohol in a 4 liter beaker, the whole being stirred continuously with a mechanical stirrer. The total amount of alcohol used was 25 liters. After standing in the ice chest overnight, *Precipitate II* was removed by decanting off the alcohol. (*Precipitate I* was a primary proteose obtained by alcohol precipitation from the extract during its preparation and was discarded.) The alcohol was distilled off *in vacuo* from the filtrate and the solution concentrated to 500 cc. The above alcoholic fractionation was carried out using 2.5 liters of alcohol and the *Precipitate III* removed. The alcoholic filtrate was concentrated *in vacuo* to 250 cc. and *Precipitate IV* was obtained by the addition of 1.25 liters of alcohol as usual. The alcoholic filtrate was then concentrated to 125 cc. Addition of alcohol gave no further precipitation. (See Diagram I).

To the 125 cc. concentrate was added 125 cc. of saturated

DIAGRAM I
FRACTIONS OF SUPRACORSIN



ammonium sulfate solution and this was stirred for $\frac{1}{2}$ hour with the mechanical stirrer. *Precipitate V* was filtered off and to the filtrate was added 250 cc. of saturated ammonium sulfate, with mechanical stirring. *Precipitate VI* was removed and the filtrate was boiled with solid ammonium sulfate. These two precipitates were very small in amount. In a short while, a very small amount of a sticky black oily proteose was deposited upon the sides of the beaker and stirring rod. This precipitate was discarded. Large

quantities of fresh alcohol were added, with constant stirring, to the filtrate to precipitate the ammonium sulfate which was allowed to crystallize out in the ice chest. After removing most of the ammonium sulfate and distilling off the alcohol *in vacuo*, only very small amounts of nitrogen were present in the solution. No further study was made of it. Precipitates V and VI were proteose in nature (Beard, 1937) and were different from Precipitate I (proteose A) in that they were not precipitated with alcohol.

The proteose precipitates V and VI were then dissolved in water and qualitative tests for arginine and histidine were strongly positive. The total nitrogen was 491 mg. and the ammonia nitrogen 335 mg., which indicated that some ammonium sulfate was still present in the solution. No further studies were made of this fraction, due to the small amount of nitrogen present and to the fact that larger amounts of both arginine and histidine were isolated from the fractions to be described below.

Precipitates II, III and IV were peptone in nature and were combined and dissolved in 500 cc. of water, 320 cc. of which were used for qualitative tests (Beard, 1937) and 180 cc. were hydrolyzed for 24 hours with 45 cc. of concentrated H_2SO_4 . A small amount of black material separated, containing 0.03 gm. nitrogen, and was discarded. The solution was diluted and neutralized with $\text{Ba}(\text{OH})_2$, filtered, and the barium sulfate precipitate boiled out seven times with water and filtered. The wash waters were added to the original filtrate and the whole was made up to 2500 cc.

The ammonia content of this solution was 0.2735 gm. or 34.4 per cent of the total nitrogen. The whole of the ammonia was then removed by making the solution slightly alkaline with barium hydroxide, warming and drawing air through the solution. The barium and sulfuric acid were then quantitatively removed, the solution concentrated to 2 liters, and solid cupric carbonate was added to the boiling solution and the isolation of the amino acids carried out by the copper salts method of Brazier (1930).

RESULTS AND DISCUSSION.

Most of the nitrogen was isolated in the form of the different

amino acids listed in Table I. The Kirk micro Kjeldahl apparatus was used. Fairly large amounts of arginine, alanine, leucine, and phenylalanine, and smaller amounts of histidine, valine, and glutamic acids were isolated. These were identified after purification by their crystalline form and nitrogen content. It is of much interest in this connection that this peptone fraction of the extract contains 4 to 5 of the amino acids which are considered essential for the growth of normal tissue. This fact may possibly explain the beneficial effects obtained by the California Surgeons in their cancer cases. It is also possible that these amino acids, either as such, or combined in some peptide linkage, stimulate the growth of normal cells, which then crowd out the growth of the cancer cells, resulting in a disappearance (liquifaction and necrosis) of the neoplastic tissue in some of their cases. This peptide may then be analogous to that isolated by Dakin, Ungley and West (1936) as the active factor in liver extract in the treatment of pernicious anemia. The presence of organic phosphates may also point to the importance of phosphorus in organic combination with the peptide in the above clinical results.

The results of this study do not indicate whether these proteoses and peptones were extracted as such from the cortex of the sheep adrenals, or whether they were produced by the very mild hydrolysis of the cortical proteins during the preparation of the extract. We are inclined to believe that they existed as such in the glands since the mild hydrolysis for short lengths of time would hardly be considered sufficient to produce them as the temperature was never allowed to rise above 60°C. during the preparation of the extract. Coffey and Humber (1936) have recently published the clinical results of their first and second 5-year studies with this extract.

That cancer is a metabolic problem and that endocrine imbalance is involved in the experimental production of some types of tumors, especially those of the breast, cannot at present be denied. We have published a review of this aspect of the subject (Beard, 1935). Since the original publication of Coffey and Humber in 1930, a large number of articles have appeared, emphasizing the

TABLE I.
Isolation of Amino acids from the peptone fraction of Coffey Hamber extract.

Isolation (180 cc. of the 500)			T.N. = 0.794 gm.		Isolation (Calculated to 500 cc. = 50,000 cc. C.H. Extract) T.N. = 2.199 gm.				Identification			
Amino Acid gms.	Amino Acid N gms.	% of T.N.	Amino Acid gms.	Amino Acid N gms.	T.N. % (found)	T.N. % (calc)	M.P.	M.P. (obs.)				
Arginine (HCl)	0.437*	17.7	1.210	0.391	26.4**	26.8	238	236-40				
Histidine	0.038*	1.2	0.105	0.028	25.8	27.1	277	275				
Glutamic Acid	0.115*	1.4	0.319	0.030	9.49	9.52	198	199-200				
Alanine	1.396*	27.6	3.850	0.607	15.71	15.73	297	297-99				
Phenyl- alanine	1.450*	15.5	4.02	0.341	8.35	8.49	283	280-86				
Leucine	1.636*	21.9	4.52	0.482	10.61	10.69	295	294				
Valine	0.710*	9.6	1.97	0.21	11.84	11.96	315	315				
Total		94.9		2.090								

* Amino acids as first isolated.
** Purified amino acids.

* Amino acids as first isolated.

** Purified amino acids.

possibilities of various forms of organotherapy in the treatment of cancer, and the majority of them stress the value of adrenal cortex. This subject is, however, still highly controversial and no point would be gained by citing these publications here.

The role of amino acids in developmental growth and its possible significance in the cancer problem has been studied by Hammett (1936) for a number of years. Voegtlin, Johnson, Maver and Thompson (1936) have shown that glutathione, tryptophane, cystine and lysine, each, will greatly increase the growth of spontaneous mammary tumors in mice. It is of much interest, therefore, that these four substances are absent from the Coffey-Humber extract. On the other hand Connor, Carr and Ginzton (1936) obtained necrosis and regression of the Jensen rat sarcoma by means of injections of cysteine-HCl into the tumor. This result was due to the amino acid and not to the hydrochloric acid. The rats also proved resistant to subsequent reinoculation with this growth as well as the Emge sarcoma. Sharpless fed 125 young rats on a complete diet containing 4 per cent of casein and 200 on a complete stock diet. All of the animals fed on the low casein for 3 or more months developed hyperplasia of the epithelium of the forestomach accompanied by the appearance of considerable papilloma formation. All of these cancerous changes could be prevented by adding cystine to the low protein diet. No pathological changes occurred in the animals fed on the stock diet.

A quotation from the paper of Vogelaar and Erlichman (1936) upon "The Significance of Amino Acids for the Growth in Vitro of Human Fibroblasts" is very interesting in this connection. They stated, "In view of the fact that amino acids may some day prove useful in the treatment of human cancer, it seems highly desirable to investigate extensively their influence on the growth in vitro of both normal and pathological human tissue".

Another paper of unusual interest in cancer research has recently been published by Roffo (1937). Rats bearing carcinomas and sarcomas were injected with a hydrolysate of muscle tissue. In 20 days all tumors had disappeared and at 80 days the

animals were still living and free from the tumors. Quoting Ruffo, "One is in presence of an action of the products of disintegration of the tissue proteins. This disintegration has been carried on to the maximum degree. The experiments that the author is actually performing with the products of this disintegration, with the amino acids, corroborate up to now this way of thinking".

Of unusual interest in this connection is the recent report of Creech and Franks (1937). These investigators were the first to attempt to alter the chemical constitution of a carcinogenic hydrocarbon. They coupled anthracene and dibenzanthracene to various proteins by means of a carbamide linkage. In 33 mice dibenzanthracene was injected and in 11 months 30 of these developed tumors at the site of the injection. Into the opposite flank of the same animal at the same time there was injected the dibenzene-carbamite-casein compound. No tumors appeared at the site of injection. Therefore, the casein blocked the carcinogenic action of the hydrocarbon. These results were confirmed in two other species of animals. Glycine, however, could not replace casein, since in this case 7 out of 17 mice developed tumors at the site of injection within 5 months.

At the thirty-first annual meeting of the American Association for Cancer Research held recently in Atlantic City, Bures, Jackson and Aub (1938) reported a paper on the inhibition of growth of amines. These substances are very closely related chemically to the amino acids. Thus the great importance of the proteins and amino acids to the great cancer problem is gradually being recognized.

CONCLUSIONS.

A final report on 6 years' work to determine the chemical compounds present in an aqueous extract of the cortex of the suprarenal glands of sheep used in the treatment of human malignancy by Coffey and Humber showed the following:

1. The extract does not contain the following substances: protein, fat, sterols, choline, carbohydrate, glycuronic acid, cortin,

epinephrin, guanidines, amines, purines, nitrogenous bases, ascorbic acid, tyrosine, tryptophane, cystine, glucosamine, ketones, phenols, aldehydes sulfur, iodine, iron or calcium.

2. The total solid content of 50 liters of the clinical extract was 25.3 gm., of which 11.0 were inorganic and 14.3 organic. Organic and inorganic phosphates were 0.86 and 2.28 gm. respectively. Chlorides were 7.0 gm. (some of which was added as HCl in the preparation of the extract). Chlorides and phosphates occurred as the sodium salts. Potassium was absent.

3. The nitrogen of the extract was present in the form of proteoses and peptones. The small amount of the former consisted largely of the amino acids, arginine and histidine.

4. The 14 gm. of organic solids contained 2.195 gm. total nitrogen, of which 2.082 gm. was isolated from this peptone fraction, in grams, as follows: arginine (HCl) 1.21; histidine 0.10; glutamic acid 0.319; alanine 3.85; phenylalanine 4.02; leucine 4.52; and valine 1.97.

5. It was concluded that these amino acids were present in the extract in a peptide union (peptone), possibly combined with phosphorus.

6. The importance of the amino acids in the study of cancer was briefly discussed.

I wish to acknowledge the interest and cooperation of Drs. Coffey and Humber and of their research staff in San Francisco in my work. They have supplied generous quantities of their clinical extract and have financed these studies, for which my best thanks are due.

BIBLIOGRAPHY.

- Beard (1937): *Pacific Coast Med.*, **4**, 4.
 Beard (1935): *Arch. Int. Med.*, **56**, 1143.
 Brazier (1930): *Biochem. J.*, **24**, 118.
 Brues, Jackson and Aub (1938): Paper delivered before the 31st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Atlantic City, N. J., May 2.
 Coffey and Humber (1930): *California and Western Med.*, **33**, 640.
 Coffey and Humber (1936): *California and Western Med.*, **44**, 5.
 Connor, Carr and Ginzton (1936): *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **34**, 374.

Creech and Franks (1937): Am. J. Cancer, **30**, 553.

Dakin, Ungley and West (1936): J. Biol. Chem., **115**, 771.

Hammett (1936): Symposium A. A. A. S., No. 14, p. 167.

Roffo (1937): Bol. del. Instit. de Med. Exper para el estud. y. trat. del
cancer, Ano XIV, 257, Sept.

Sharpless, (1937): Ann. Surg., **106**, 562.

Voegtlin, Johnson, Maver and Thompson (1936): Symposium
A. A. A. S., No. 4, p. 162.

Vogelaar and Erlichman (1936): Am. J. Cancer, **28**, 301.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XLV. "Sublingual Mucoid" and An Artificial Saliva Mucin.

By

YASUHISA TANABE.

*(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)*

(Received for publication, December 16, 1938)

From the watery extract of the sublingual gland (of a bull), an acid soluble glycoprotein was isolated after removal of the mucin. The writer named it "sublingual mucoid."

The constituents of its prosthetic group were not only identical with those of the acid soluble fragment (Tanabe, 1939 ii) which had been obtained by alkaline rupture of sublingual mucin, but also resembled the latter strikingly in quantitative relations in the molecules, as will be illustrated below. The other product of the mucin by alkaline scission, which was insoluble in acid, involved but a minor quantity of the glucosamine-mannose complex (Tanabe, 1938 and 1939, i) and appeared to be a derivative of a simple protein. Therefore it appeared that sublingual mucin is composed of the present mucoid and a simple protein. The mucoid distinctly exceeded the acid soluble mucin fragment, with regard to the content of the carbohydrate moiety as a whole, but an explanation may be given, if it is assumed that the protein conjugated in the mucin was partially decomposed in the course of preparation and the non-dialysable cleavage products thus formed were separated together with the mucoid as the acid soluble fraction, resulting in a low value of the carbohydrate grouping of this fraction.

Evidence that the mucoid is capable of binding simple proteins would furnish an argument for the above speculation. For this purpose, mucoid solution was mixed with gelatin solution and acidified with acetic acid according to Mörner's principle, whereby

precipitation occurred. The deposit exhibited, in solution, characteristic viscosity and optical rotation divergent from the values which would have been obtained if it had been only a mixture. Hence, that the mucoid can conjugate simple proteins is beyond any doubt. As gelatin raised the viscosity of the mucoid by coacervation, the extraordinary viscousness of the solution of sublingual mucin must be ascribed to the simple protein in it which is perhaps very effective in this direction.

In all probability, the extract of sublingual gland contained the mucoid more than corresponding to that simple protein and the excess remained in the mother liquid after precipitation of the mucin.

EXPERIMENTAL.

1. Sublingual Mucoid.

Preparation.

The sublingual gland of a bull was extracted with water and the mother liquid, after precipitating out the mucin,¹⁾ was neutralized with 5% NaOH and evaporated on a water bath to about 1/10 volume. After dialysis for 1 day, the liquid was evaporated further on the bath to a small volume (to about 1/100 of the mother liquid of the mucin). The precipitates which came out in the meanwhile were discarded and to the supernatant liquid were added 5 volumes of 95% alcohol. Deposits were collected and washed with several changes of alcohol and with ether.

The crude product was taken up in a small volume of hot water, cooled and the insoluble part was centrifuged off, then pH of the supernatant liquid was brought to round 4 by means of acetic acid in order to get rid of the remaining mucin. Dialysis and condensation of the solution were made when necessary, and the mucoid was precipitated again with 5 volumes of alcohol, followed by drying similarly as above. Redissolution, removal of

1) As regards the procedure, the reader is referred to the first paper on sublingual mucin (Tanabe, 1938).

mucin and reprecipitation were repeated until the product became clearly soluble both in water and in acid. A yield of 0.64 gm was obtained per 1 kilogramme of the gland.

Prep. IV was prepared by carrying out the evaporation of the solution at low temperature and reduced pressure so as to avoid possible degradation of the mucoid and the residue of the mucin. The crop was alike.

Qualitative assays.

a. Protein reactions.

Biuret, Millon's, Sakaguchi's, Hopkins-Cole, diazo (orange red), ninhydrin, Molisch (violet red) and reduced sulfur test were all positive.

Phosphotungstic acid, tannic acid, trichloroacetic acid and ammonium sulfate (at half saturation) precipitated it, while mercuric acetate, mercuric chloride and potassium ferricyanide (with acetic acid) did not. Heat coagulation did not take place.

b. Phosphorus was not detected.

c. After hydrolysis with hydrochloric acid, barium chloride produced turbidity.

d. Red coloration was given by dimethylaminobenzaldehyde immediately (Blix's test). Previous heating of the mucoid solution with alkali was not needed.

e. Tests with aniline acetate and naphthoresorcinol were positive, but the color developed was very faint.

*Quantitative Analysis.*¹⁾

The data obtained will be embodied in general in Table I.

From what the analytical figures indicate, preparation at low temperature is not particularly preferable.

A typical example which identified the ordinary sugar with galactose will be given in Table II.

1) Analytical procedures were cited in the first paper on sublingual mucin (Tanabe, 1938).

TABLE I.
Analyses of the mucoid specimens.

Analyses	In per cent				Expressed as equivalents per equivalent weight			
	Prep. I	Prep. II	Prep. III	Prep. IV ¹⁾	Prep. I	Prep. II	Prep. III	Prep. IV
Nitrogen	10.9	11.8	10.6	11.0				
Total reduction after acid hydrolysis ²⁾ , as glucose	24.0	23.7	22.1	22.5				
Carbohydrate reduction ²⁾ , as glucose	17.8	18.0	17.9	18.2				
Glucosamine	23.6	21.7	20.7	21.0	1.00	1.00	1.00	1.00
Glucuronic acid, by furfural method	5.7	5.3	6.1	5.5				
Ordinary sugar, as galactose	4.3	4.2	4.0	4.2	0.18	0.19	0.19	0.20
CH ₃ CO	10.0	9.1	9.5	9.7	1.77	1.75	1.91	1.93
Sulfate-S	0.09	0.09	0.07	0.08	0.02	0.02	0.02	0.02
Ash	1.5	1.7	2.0	1.5				

1) Prepared at low temperature.

2) Duration of hydrolysis: 3 hours. The reducing forces were raised neither by preliminary alkaline treatment nor by extending the duration of the acid hydrolysis to 5 hours. Prep. I, prior to acid hydrolysis, reduced ferrixyanide to the extent of 20.8% glucose.

TABLE II.

Colorimetric identification of the ordinary sugar in the mucoid by the second procedures of the Masamune-Tanabe method.

The specimen taken was Prep. I. Acid hydrolysis was continued for 4 hours.

1 cc. of the final solution corresponded to 5.6 mg of the substance.

Reaction	Reading mm	Conc. (%) of the ordinary sugar in the final solution, expressed as		
		Mannose	Galactose	Glucose
Orcinol	8.1	0.0260	0.0243	0.0373
Indole	11.8	0.0258	0.0238	0.0175
Diphenylamine I	13.5	0.0120	0.0243	0.0140

Physical properties of the watery solution

a) Optical rotation (Prep. I)

Conc.: 0.992%

$$[\alpha]_D^{18} = \frac{-0.13 \times 100}{1.0056 \times 0.992 \times 1} = -13.0^\circ$$

b) Specific refraction (the same solution as above).

Temp.: 18°C.

$$\frac{(1.33419)^2 - 1}{(1.33419)^2 + 2} \times \frac{1}{1.0042} \times \frac{100}{0.992} - \frac{(1.33236)^2 - 1}{(1.33236)^2 + 2} \times \frac{1}{0.9986} \times \frac{100 - 0.992}{0.992} = +0.193^\circ$$

c) Viscosity.

Prep. II was adapted. Temp.: 35°C. Conc.: 0.2%.

Time of outflow for water was 45 sec.

Time after commencement of measurement min.	Time of outflow sec.
0	61.2
15	61.8
30	62.0
45	61.6
60	61.8
120	61.6

mean:
61.7

Relative viscosity: 1.4

2. Artificial saliva mucin.

0.6 gm. of sublingual mucoid (Prep. II) was dissolved in 60 cc. of water, mixed with 2 volumes of 1% gelatin solution and 10% acetic acid added in small portions, until the pH was lowered to approximately 3.0, whereupon precipitation occurred. The deposit was collected and washed with dilute acetic acid (pH 3.0) three times, then dissolved in the least requisite quantity of 0.5% HCl solution and precipitated again by diluting 15 times with water. Redissolution in the dilute mineral acid and reprecipitation were performed twice more and then washed with alcohol several times

and finally with ether and dried at room temperature over P_2O_5 in vacuo. Yield, 0.38 gm in averages. Nitrogen amounted to 13.5% (13.6% in Prep. I and 13.4% in Prep. II) and glucosamine to 14.5% (14.7% in Prep. I and 14.2% in Prep. II).

3. Physical constants of sublingual mucin and mucoid, gelatin and the artificial mucin at pH 7.0 and 7.7.

Specific rotation, specific refraction and relative viscosity of the substances above were determined, the same conditions being taken for all the substances with respect to each kind of the constants.

The natural and the artificial mucin were dissolved in water by the aid of NaOH solution (1%) and the solutions of the mucoid and gelatin were adjusted to their hydrogen ion concentrations. Gelatin adapted for measurement was the commercial one which had been employed for the preparation of the artificial mucin and purified by precipitation with alcohol from its solution. It contained 17.2% nitrogen and 0.23% glucosamine. The specimen of the natural mucin was prepared as described in a previous report. The determinations were conducted as soon as possible on preparing the solutions and calculation was carried out in similar manners as in the case of the watery mucoid solution.

Figures obtained were as follow:

a) Specific rotation of 1% solution at 12°C and pH 7.7.

Sublingual mucoid (Prep. II):	-12.9°
Artificial mucin (Prep. I):	-93.7°
Gelatin:	-172.4°

b) Specific refraction of 1% solution at 12°C and pH 7.7.

Sublingual mucoid (Prep. II):	+0.201°
Artificial mucin (Prep. I):	+0.223°
Gelatin:	+0.224°

c) Relative viscosity of 0.2% at 35°C and pH 7.0.

Sublingual mucoid (Prep. II):	1.4
-------------------------------	-----

Artificial mucin (Prep. I):	1.7
Gelatin:	1.1
Sublingual mucin:	5.1

COMMENTS ON THE EXPERIMENTAL DATA.

i) As regards the mucoid, sulfate-S in the preparations is regarded as an impurity, judging from the minuteness of its quantities. The furfural yield corresponded to 5–6% glucuronic acid, but the real contents of the latter probably can approach 2–3% ad maximum, for the reason mentioned in previous papers.¹⁾ The equivalent proportion of glucosamine, galactose and acetyl was 1:0.2:2. In view of these connections, the mucoid markedly resembles the acid soluble fragment of sublingual mucin, whereas the carbohydrate grouping took up a greater part in the latter and the nitrogen was accordingly less.

ii) Calculation²⁾ from the contents of nitrogen and glucosamine shows that 67.5% of the artificial mucin was made up of the mucoid.

iii) The artificial mucin rotates D light more to the left than would a presumable mixture of its components in the same proportion, because the specific rotation of it at pH 7.7 was -93.7° , while the value of the mixture is -64.7° .²⁾ Furthermore it made a more viscous solution than either the mucoid or gelatin, as was seen. These discrepancies in physical properties between the product and the components are regarded as justified in order to

1) The first and third paper on sublingual mucin.

2) If x be the amount (%) of the mucoid in the artificial product,

$$(11.8 \times x) + \{17.2 \times (100 - x)\} = 13.5 \times 100,$$

where 11.8 and 17.2 are the nitrogen values of the mucoid and gelatin respectively and 13.5 that of the artificial product.

Then we obtain

$$x = 68.5$$

By calculation from glucosamine contents in a similar manner we get

$$x = 66.5$$

The mean of x is therefore 67.5

$$3) \quad -12.9^\circ \times 0.675 + (-172.4^\circ \times 0.325) = -64.7^\circ$$

distinguish the former—as a compound—from a simple mixture, although no noticeable divergency was recognized in the refractive index.

SUMMARY.

1. An acid soluble glycoprotein was isolated from the sublingual gland. It was called “sublingual mucoid.” Its carbohydrate grouping was constituted similarly to the corresponding grouping of the acid soluble fragment of sublingual mucin.

2. The mucoid conjugated gelatin to form an artificial saliva mucin.

3. From the facts above, it was concluded that sublingual mucin is composed of sublingual mucoid and a simple protein which involves the glucosamine mannose complex recorded in a previous communication.

The Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan gave a grant towards the cost of this research. The writer acknowledges it gratefully.

REFERENCES.

- Blix, G. (1936): *Zeits. f. Physiol. Chem.*, **240**, 43.
Mörner, C. T. (1894): *Zeits. f. Physiol. Chem.*, **18**, 233.
Tanabe, Y. (1938): *Journ. of Biochem.*, **28**, 227.
Tanabe, Y. (1939, i): *Journ. of Biochem.*, **29**, 375.
Tanabe, Y. (1939, ii): *Journ. of Biochem.*, **29**, 379.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XLVI. Mucin from Umbilical Cord.

By

MASAMI SUZUKI.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, December 16, 1938)

From umbilical cords, Levene and López-Suárez isolated in 1918 the alleged sulfuric ester of mucoitin, and Meyer and Palmer recently "polyuronic acid" which had the structure of mucoitin. As, however, isolation was performed by them directly from the tissues, it did not settle the problem as to whether or not mucoitin constitutes the prosthetic group of funis mucin, or at least is precipitated by acid from the watery tissue extract as combined with protein.

In this connection, Karlberg suggested, after isolation and analyses of the mucin, that mucoitinsulfuric acid¹⁾ can make up at most a small part of the carbohydrate grouping of this glycoprotein and that the latter consists of a glucosamine-hexose (probably mannose) complex.

Contrary to Karlberg's statement, the writer was able to separate mucoitin in a large yield from the mucin, as already reported (Suzuki, 1938, ii). The present account deals with experiments to test the possible occurrence of the glucosamine-hexose complex, together with mucoitin, in the mucin molecule, as was observed in chondro- as well as osseo-mucoid by Dr. Hisamura in our laboratory.

EXPERIMENTS AND COMMENTS.

Preparation of Funis Mucin.

The umbilical cords were freed from blood vessels and washed

1) Mucoitin free from sulfate rest was not known to him.

with water, then minced and dehydrated by placing in 95% alcohol for 3-4 days. 100 gm of material thus dried was extracted with 3 liters of cold water for 1 day and the extract was separated by centrifuging and colating through a folded cotton gauze. It was yellowish and ropy and reacted neutrally. Extraction was repeated twice. Mucin was precipitated from the combined extract by the aid of 100 cc. of 30% acetic acid.¹⁾ The deposit was washed with water until the acetic acid was eliminated as completely as possible, then suspended in 200 cc. of water and dissolved by addition of a dilute K_2CO_3 solution. Alkalinity of the solution was maintained within pH 7.5 and the mucin was precipitated again with acetic acid. The process of purification was carried out twice more and the product was washed with several changes of alcohol, then with ether and finally dried in vacuo over P_2O_5 at room temperature. Crops of 2.0 and 2.2 gm were obtained.

Qualitative Assyes.

Biuret, xanthoproteic, Millon, Sakaguchi and diazo (orange red) reaction were positive. Molisch reagents produced green coloration. Hopkins-Cole and Morse tests were not given.

$(NH_4)_2SO_4$ (at half saturation) and mercuric acetate produced merely turbidity, while mercuric chloride, trichloroacetic acid, tannic acid and phosphotungstic acid precipitated it well. Heat coagulation did not take place.

Phosphorus was not detected.

Blix's test with the Ehrlich's reagent was given immediately without preliminary heating of the alkaline solution.

Neuberg-Saneyoshi and aniline acetate test for uronic acid were positive.

Both of the preparations formed very viscous solutions.

Quantitative Data.

Figures in Table I were obtained by the analytical procedures which had been employed in previous investigations of this series.

1) pH was brought to about 2.4.

TABLE I.
 Analyses of funis mucin.

Analyses	In per cent		Expressed as equivalents per equivalent weight	
	Sp. I	Sp. II	Sp. I	Sp. II
Nitrogen	12.20	12.33	10.34	10.00
Total reduction after acid hydrolysis, as glucose	34.92	35.84		
Carbohydrate reduction, after acid hydrolysis, as glucose	21.30	20.05		
Glucosamine	15.08	15.75	1.00	1.00
Glucuronic acid				
i Furfural method	16.32	16.56		
ii Indole method	15.66	16.50		
iii Orcinol method	16.20	17.09		
mean:	16.06	16.72	0.98	0.98
Acetyl	4.15	4.27	1.15	1.13
Sulfate-S	0.15	0.16	0.006	0.006
Ash	0.71	0.62		

The nitrogen contents were less than in those prepared by Jernström (13.90–14.42%) and Oldfeldt (13.6%). They extracted the mucin directly from fresh tissue, while the writer prepared it from tissue dried in advance with alcohol. Based on the view that coagulable proteins in the tissue were denatured by alcohol and accordingly escaped from extraction, the writer considers the present preparations purer than the previous authors'.

The acid hydrolysates reduced ferricyanide, after treatment with phosphotungstic acid, to the extent of 21.30% and 20.05% glucose. These forces correspond to 32.4%¹⁾ and 30.5%¹⁾ mucioitin, when computed from the reducing force of the latter compound, and the values of glucuronic acid indicate that mucioitin takes up

1) $21.30\% \times \frac{100}{65.67} = 32.4\%$; $20.05\% \times \frac{100}{65.67} = 30.5\%$. Refer for the reducing force of mucioitin to the preceding paper of the writer (1938, ii).

32.1% and 33.4% respectively of the preparations, in good agreement with the former calculation. In the next, the result of the Molisch test and the coincidence of the figures of glucuronic acid by the furfural method with those by the indole and orcinol reaction which produce color from all of the non-aminosugars are regarded as furnishing arguments against the presence of any true-sugar-containing carbohydrate. Finally, glucosamine did not exceed the equivalent of glucuronic acid. From these facts, the writer believes that mucoitin is the sole polysaccharide existent in funis mucin.

Acetyl values amounted to a little more than the equivalent of the aminosugar. It is probably due to the other constituents, because, in our determination method, sugars and proteins also yield volatile acids¹⁾ to a slight extent and hence higher values than the actual are liable to be given, particularly when the content is small. Sulfate-S was detected. But, the minuteness of its quantities leaves no room for doubt that it was an inorganic impurity.

CONCLUSION.

Mucoitin is the only carbohydrate present in funis mucin.

The writer is indebted to the Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant towards the expense of this research.

REFERENCES.

- Blix, G. (1936): *Zeits. f. Physiol. Chem.*, **240**, 43.
Hisamura, H. (1938,i): *Journ. of Biochem.*, **28**, 217.
Hisamura, H. (1938,ii): *Journ. of Biochem.*, **28**, 509.
Jernström, E. A. (1880): *Jahresber. ü. d. Fortschr. d. Tierchem.*, **10**, 34.
Karlberg, O. (1936): *Zeits. f. Physiol. Chem.*, **240**, 55.
Levene, P. A. and López-Suárez (1918): *Journ. of Biol. Chem.*, **36**, 105.
Meyer, K. and Palmer, J. W. (1936): *Journ. of Biol. Chem.*, **114**, 689.
Oldfeldt, Carl-Olof (1936): *Zeits. f. Physiol. Chem.*, **240**, 249.
Suzuki, M. (1938,i): *Journ. of Biochem.*, **27**, 367.
Suzuki, M. (1938,ii): *Journ. of Biochem.*, **28**, 517.

1) Consult the publication on the analytical method (M. Suzuki, 1938,i).

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XLVII. Polysaccharides from Umbilical Cord.

By

MASAMI SUZUKI.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, December 16, 1938)

In a previous investigation, the writer could not corroborate the assertion of Karlberg that a hexose-containing complex makes up the prosthetic group of funis mucin. However, the watery extracts, from which the mucin was prepared, always indicated by the Molisch reagents that they involved an ordinary sugar in high concentrations. The possibility is therefore not excluded that a glycoprotein, whose carbohydrate grouping is the one which Karlberg found, might have been in solution. Experiments which will be described in this communication did not substantiate such a supposition as above but revealed the existence of a glucan and, in addition, a substance which is either allied to chitin in composition or is an acetylglucosamine-glucose complex.

After repeated condensation and acidification in order to remove the remaining mucin, the writer collected the whole alcohol-precipitable substance from the mother liquid (Prep. I). It was free from glycogen. It gave biuret reaction but appeared, judging from the reducing force of its hydrolysate, to be carbohydrates in the main, contrary to the expectation that it would be the supposed glycoprotein. Moreover, the nitrogen content did not exceed the value corresponding to the total sum of glucosamine and the rest of mucin which had not yet been got rid of, even if the calculation of the mucin was made from a value of the uronic acid¹⁾ lower than that obtained for reasons which will be

1) That mucitin was not present in a free unconjugated state was ascertained by the observation that none of it remained after removal of the mucin from the extract.

cited below. From these considerations, it was concluded that no glycoprotein exists other than the mucoitin-containing mucin in water extractable form, in umbilical cords.

Simultaneously with the above finding, the speculation occurred from analysis of the same specimen that some polysaccharide composed of glucosamine and an ordinary sugar might be present, because glucosamine was involved in it in a great excess over the equivalent of glucuronic acid. Therefore, an effort was made to isolate it in a pure state, by various gentle operations, not only from the specimen above but also by starting repeatedly with new materials of tissue. In some (Prep. II, VI and VII) of the mucin-free products both glucosamine and ordinary sugar (which was identified with glucose) were contained, but their mutual proportions were not coincident from one preparation to another, while in the other (Prep. III-V) even aminosugar was completely deficient and glucose alone was found. The substance in the latter preparations could not be hydrolysed by malt amylase and gave no iodine reaction for glycogen. It was accordingly a glucan but different from glycogen. The former preparations were then accepted as mixtures of a chitin-like polysaccharide and either hexosan or a complex of glucose and acetylglucosamine.¹⁾

The writer regrets that he had to give up a more detailed study of those polysaccharides owing to the lack of material.

EXPERIMENTAL.

Preparation.

Mother liquids of funis mucin were obtained as described in the foregoing article in all cases.

Prep. I.

200 gm. of the dry tissue powder were employed. The mother liquid of the mucin was evaporated to about 600 cc. on a bath, the solution was nearly neutralized by means of a dilute NaOH solu-

1) Acetyl in the preparations was present in the amounts equivalent to glucosamine.

tion and, after dialysis against running water for 1 day, it was evaporated further on a bath to about 200 cc. The precipitates which came out were centrifuged off and to the supernatant liquid was added 7 volumes of 95% alcohol, whereby deposits of a brownish hue appeared. The substance was dissolved again in 200 cc. of water, and the solution was acidified by means of 30% acetic acid, and submitted, after removing the precipitates, to neutralization, dialysis, condensation and precipitation with alcohol. These procedures for removing the rest of the mucin were repeated, until turbidity scarcely occurred by acidification of the solution. The final product was washed with alcohol and ether and dried. Yield, 1.0 gm.

Prep. II.

The mother liquid begun with (3 liters) was neutralized, in this case, in advance of evaporation. The initial crude product was submitted to the purification procedures described above seven times. In the last two runs a small quantity of kaolin was used in order to eliminate the final trace of mucin, which produced opalescence but could not be got rid of by centrifuging. In the last three runs, neutralization and dialysis were dispensed with and alcohol was poured into the acid solutions. The used tissue powder was 100 gm and the yield was approximately 100 mg.

Prep. III.

A product of nearly 200 mg was obtained from 100 gm of the dried tissue, in a manner similar to Prep. II. But it still gave a positive biuret reaction. Therefore, 80 mg of it were dissolved in 10 cc. of water and stood for 3 hours, after the addition of 1 gm of trichloroacetic acid. The precipitate was separated on a funnel and to the filtrate was added a small amount of sodium acetate and 10 volumes of alcohol. Crop, 30 mg.

Prep. IV.

200 mg of Prep. I were dissolved in 15 cc. of water, and shaken with 4 cc. of a chloroform-amylalcohol mixture (3:1) for 12 hours.

The chloroform-amylalcohol-protein jelly was separated off by centrifuging, and the mucoitin which had been cleft up from the mucin, and the mucin which still remained in the solution, were carried down by means of 15 volumes of glacial acetic acid. On addition of ether to the supernatant liquid after centrifuging, deposits were obtained which weighed, in a dry state, 80 mg.

Prep. V.

300 mg of Prep. I were submitted twice to the procedures by which Prep. III was prepared and dried with alcohol and ether. The product amounted to 120 mg.

Prep. VI and VII.

We started in each case with 100 gm of the dried tissue and the substance obtained by the processes of Prep. III was dissolved in water and agitated with 5 gm of barium carbonate powder for 24 hours on a bath, water being added from time to time. It was then cooled and filtered. The filtrate was precipitated with glacial acetic acid. After washing with alcohol and ether and drying in vacuo, the product was again dissolved in 10 cc. of water and shaken with the chloroform-amylalcohol mixture for 12 hours. The mixture was centrifuged and the watery layer was precipitated with glacial acetic acid. The final products, washed with alcohol and ether and dried in vacuo over P_2O_5 , weighed 50 and 35 mg respectively.

Analysis.

The data will be tabulated in Table I.

TESTS AND COMMENTS ON THE QUANTITATIVE DATA.

The figure obtained in Prep. I by the orcinol reaction was divergent as glucose, beyond the analytical limit, from that by the indole reaction. This is ascribed to glucuronic acid, because the coloration of this sugar derivative in the former reaction is more intensive than in the latter, when expressed as that hexose. But the sequel of the diphenylamine reaction, in which a genuine blue

TABLE I.
Analytical values are expressed in per cent.

Analyses	Prep. I	Prep. II	Prep. III	Prep. IV	Prep. V	Prep. VI ²⁾	Prep. VII ²⁾
Nitrogen	4.34	4.39	1.90	4.73	3.00	2.89	3.06
Total reduction, after hydrolysis, as glucose	73.37	66.66	53.65	57.14	80.25	82.50	81.92
Carbohydrate reduction after hydrolysis, as glucose	60.92	57.40	50.84	50.00	80.00 ¹⁾	82.50	81.42
Glucosamine	26.01	4.03	0.0	0.0	0.0	29.87	35.82
Glucuronic acid, by the furfural method	5.83						
Non-amino sugar, as glucose							
i) by orcinol react.	34.25	54.16	52.63	52.63	79.72	52.50	45.00
ii) by indole react.	31.48	52.08		50.00	79.05	52.50	44.28
iii) by diphenyl- amine I react.	32.40	52.08	50.51		77.70	50.00	44.28
Acetyl	5.80	1.11				7.42	8.94
Ash						5.07	

1) The carbohydrate reduction was not lowered by the lead-barium treatment (Masamune-Tanabe method) of the hydrolysate which was an indication that no glucuronic acid was involved in the preparation.

2) Prior to hydrolysis, Prep. VI reduced ferricyanide to the extent of 14.14% glucose and prep. VII to the extent of 15.00%.

color was developed as though by a pure glucose solution, indicated the smallness of the quantity of the uronic acid in this specimen, because, even in 1/7 equivalent, it shifts the color tone of hexose from blue to violet and interferes with colorimetry. Probably, the value of the uronic acid obtained was higher than the actual value owing to the production of furfural from the glucosamine and hexose.¹⁾ In all the other preparations the ordinary sugar was well identified with glucose by the colorimetric means. The values

1) Refer to the paper of Tanabe (1938).

differed markedly from one reaction to another when calculated as mannose, galactose or fructose.

All the preparations gave negative iodine test for glycogen.

By the reduction method, it was proved¹⁾ that the glucan was not hydrolysable by malt amylase.

In Prep. I, aniline acetate and naphthoresorcinol test for uronic acid were positive. The other preparations did not give those tests. The presence of fructose was negated by Seliwanoff's test on Prep. VI. The carbohydrate reductions were in agreement with the total sums of those sugars individually estimated in respective preparations or with the values of glucose in the preparations in which glucose alone was found. From these facts, it is obvious that no sugar other than those listed in the table were present in the specimens.

Prep. I gave a positive biuret reaction, but Prep. II-VII did not, although some of them were contaminated with nitrogenous impurities.

SUMMARY.

1. Any glycoprotein which contains a glucosamine-hexose complex (as Karlberg assumed) could not be found in the watery extract of umbilical cords.

2. A kind of glucan was isolated. Further, a polysaccharide which is either allied to chitin in composition or is an acetyl-glucosamine-glucose complex is believed to exist in the cords in a free state.

The writer wishes to thank the Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant towards the costs of this investigation.

REFERENCES.

- Suzuki, M. (1939): *Journ. of Biochem.*, **29**, 447.
Tanabe, T. (1938): *Journ. of Biochem.*, **27**, 251.

1) Prep. VI and VII were used.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XLVIII. An Estimation of Free Blood-Sugar in the Co-presence of Aminosugar.

BY

MASATO YOSITAKE.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, December 16, 1938)

To estimate the free glucose in a glucosamine-containing blood, by making use of its reducing property, the deproteinizing process of Fujita and Iwatake was found useless, while it is most recommendable for removing all the physiological reducing components except glucose. As it is an already-established fact that amino sugars are carried down from their solutions by mercuric oxide (Bierry and Magnan; Masamune and Tanabe), the writer undertook to devise a new process by means of the salts of this metal. The efforts, however, led to the recognition that the principle of the method which Dumazert and Bierry had elaborated for measurement of glycemia in 1935, met the purpose in the most simple way, although they had not intended to remove amino sugars by their reagents. By using ferricyanide instead of hypoiodite, which gives less accurate values than the former, the writer modified the whole analytical procedure of those authors, as will be seen in the following.

REAGENTS.

1. Dumazert and Bierry's mercurio-cadmium reagent.
2. NaOH solutions.
 - a) NaOH solution which neutralizes exactly an equal volume of the mercurio-cadmium reagent when estimated by the means of Dumazert and Bierry.
 - b) NaOH solution which is less concentrated than the

a) solution by 0.18 normality.

3. Reagents employed by Fujita and Iwatake for estimating the reducing forces of blood filtrate.

TECHNIQUE.

Take 1 cc. of blood¹⁾ with 2 cc. of water and stir up well with a glass rod with 2 cc. of the mercurio-cadmium reagent. Next, pipette in 2 cc. of the NaOH b) solution in drops under shaking and agitate again thoroughly, centrifuge after 15 minutes and filter the supernatant liquid. Take 1 cc. of the clear filtrate into a test tube, and 11 cc. of water and 4 cc. of the ferrieyanide-phosphate solution and follow further the technique of Fujita and Iwatake.

Carry out the blank determination, using water in place of blood and NaOH a) solution instead of the b) solution.

CALCULATION.

Subtract the cc. of the thiosulfate (0.005*n.*) solution used in titrating the unknown from the cc. used in titrating the blank and multiply 700/6.14 to obtain the mg of glucose per 100 cc. of blood.

EXPERIMENTAL.

1. Neutral filtrates could not be obtained by the writer after deproteinization of various kinds of blood (rabbit, pig and bull), when the NaOH solution prepared according to the original directions of Dumazert and Bierry was used, while the titre preferred here was found suitable for the bloods enumerated.

2. Table I will demonstrate that the present method is available for measurement of glucose in blood containing 200 mg or less of glucosamine per 100 cc.

In glucosamine-free blood, Hagedorn-Jensen's method gave higher value of glucose than Fujita and Iwatake's. Irrespective of whether glucosamine had been added to the blood or not,

1) Ammonium oxalate is used as an anticoagulant.

TABLE I.

Method of analysis	Glucosamine hydrochloride added per 100 cc of blood mg	Reducing force, expressed as glucose in per cent										Pig blood I
		Rabbit blood								Bull blood I		
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII			
Hagedorn-Jensen	0.0	0.110	0.110	0.103	0.110	0.110	0.102	0.094	0.104	0.080	0.092	
	0.0				0.089	0.094	0.092	0.080	0.089	0.069	0.082	
Present method	0.0	0.084	0.099	0.094	0.088	0.094	0.093	0.080	0.088	0.067	0.082	
	2.0			0.099			0.093	0.080	0.088	0.068	0.082	
	2.5											
	3.0				0.092	0.101						
	5.0	0.096	0.116	0.108								

the present modification of Dumazert and Bierry's method gave figures coincident with those of glucosamine-free blood obtained by Fujita and Iwatake's method, which gives the accurate quantity of fermentable sugar, as already mentioned. When more than 250 mg of glucosamine are present in 100 cc. of blood, a part of it is seen to escape from retention on the filter.

The Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan gave a grant for defraying the cost of this research, which is gratefully acknowledged.

REFERENCES.

- Bierry, H. and Magnan, M. C. (1933): C. R. de la Soc. de biol., **114**, 257.
Dumazert, C. and Bierry, M. (1935): C. R. de la Soc. de Biol., **119**, 737.
Fujita, A. and Iwatake, D. (1931): Biochem. Zeits., **242**, 43.
Masamune, H. and Tanabe, Y. (1938): Journ. of Biochem., **28**, 19.

ÜBER DAS KUPFER IM ORGANISMUS, BEOBACHTET VOM STANDPUNKT SEINES PHYLOGENETISCHEN, ONTOGENETISCHEN UND GESCHLECHTLICHEN UNTERSCHIEDS AUS.

III. Mitteilung:

Die ontogenetische Untersuchung von Kupfer und Eisen im Blut der Hühnerembryonen.

VON

SATORU KAMEGAI.

(Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Fakultät zu Nagasaki.
Direktor: Prof. Dr. D. O g a t a.)

(Eingegangen am 9. Januar 1939)

EINLEITUNG.

Verfasser hat in der I. und II. Mitteilung das Verhältnis zwischen Kupfer und Eisen vom phylogenetischen Standpunkt aus studiert. Bekannt ist, dass die Ontogenese nichts anderes als eine Wiederholung der Phylogenie in einem Individuum ist; so kann dasselbe Verhältnis von Eisen und Kupfer in der ontogenetischen Entwicklung nachgewiesen werden.

Das Eisen bzw. Kupfer in der Leber der Embryonen ist schon vielfach systematisch untersucht worden. Ebenso die Veränderung des Blutes nach der Geburt. Die quantitative Veränderung dieser Elemente in der Embryonalzeit ist jedoch bisher kaum studiert worden.

Verfasser hat daher die Veränderung des Eisen- bzw. Kupfer-Gehalts des Blutes bei den verschiedenen Entwicklungsstadien der Hühner systematisch verfolgt.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. Versuchsmaterial.

Als Material wurde das Gesamtblut aus Hühnern (hauptsäch-

lich weisse Leghorn) in verschiedenen Entwicklungsstadien gebraucht. Die Eier wurden unter möglichst gleichen Bedingungen in dem elektrischen Brutofen künstlich bebrütet. Die 24 Stunden nach dem Beginn der Bebrütung wurden als der erste Tag bezeichnet, und der 21ste Tag der Bebrütung entspricht dem ersten Tag nach Ausbrütung. Die Gefässe sind in den ersten Tagen sehr zart, auch ist das Blut so mangelhaft, dass man vor dem 9ten Tage der Bebrütung nicht imstande ist es zu bestimmen. Für die Kupfer-Bestimmung ist eine ziemlich grosse Menge Blut nötig; sie wurde jeweils einigen Embryonen entnommen und zusammengestellt.

Die Blutentnahme geschieht sehr sorgsam. Zuerst wird die Schale, dann die Schalenhaut mit einer Schere geöffnet. Nachdem die seröse Flüssigkeit herausgenommen wurde, wurden die Gefässe in der Flüssigkeit sorgfältig mit einer Pinzette herausgehoben und mit einer Spritzennadel durchstochen und das herausickernde Blut in einen Tiegel gesammelt. In dem früheren Entwicklungsstadium der Eier manipuliert man günstiger von der Luftkammer des Eies aus. In dem späteren Stadium aber geht es leichter vom spitzen Ende des Eies aus.

2. Bestimmungsmethode.

Kupfer und Eisen wurden mit dem Polarograph bestimmt. Die Elektrolyse wurde in derselben Weise wie in der vorangehenden Mitteilung ausgeführt. Für das Kupfer wurde also das Gesamtblut verascht und direkt bestimmt und für das Eisen wurde es vorher von dem Kupfer durch Ammoniakwasser befreit.

RESULTATE.

Der Gehalt an Eisen und Kupfer auf mg für je 100 g frischer Substanz wurde systematisch angeordnet. Ihm folgt der Fe/Cu-Index in derselben Reihenfolge. Siehe Tabelle I-V und Fig. 1-5.

TABELLE I. (Cu-Gehalt im Blut der Hühnerembryonen).

Bebrüt. dauer Tage	Temp. °C	K. gew. g	Zahl d. Embryo- nen	Frisch. Subst. g	Halb- stufenp. mV	Kurven- höhe mm	Cu mg in 100 g Fr. Sub.
9	28.7	2.3	11	1.5855	-75	50	0.5321
11	22.0	4.75	10	2.2204	-82	76	0.4727
"	28.6	"	4	1.2104	-84	43	0.5502
13	28.0	9.3	"	1.6538	-71	50	0.5108
"	"	9.1	"	1.8896	-83	37	0.2641
15	23.7	11.7	9	5.1709	-74	80	0.4325
"	29.8	14.0	4	1.4657	-82	41	0.3968
"	"	14.6	3	1.5456	-76	37	0.3229
17	28.2	20.7 ♂	2	1.6576	-63	45	0.4229
"	30.0	21.7 ♀	4	1.0204	-67	34	0.4045
19	22.6	36.5 ♂	5	1.6554	-73	42	0.4151
"	28.0	39.2 ♂	2	1.5093	-71	27	0.1844
"	"	" ♀	5	1.7653	-63	39	0.3132
21	21.7	35.5 ♂	3	2.0581	-78	30	0.2866
"	30.0	36.7 ♂	2	1.9324	-59	42	0.3280
"	"	36.0 ♀	"	1.7801	-67	30	0.1833
"	"	35.0 ♀	"	1.6317	-76	43	0.3965

Nach der Ausbrütung

1T.	23.2	37.5 ♀	3	2.4668	-75	45	0.3035
2 "	29.0	34.5 ♂	1	1.4027	-64	48	0.4562
"	"	31.0 ♂	2	1.5305	"	38	0.2718
"	24.0	29.5 ♀	"	1.8509	-79	35	0.2562
"	"	28.0 ♀	1	1.2216	-88	30	0.2671
"	27.5	34.0 ♀	2	2.0167		38	0.2658
1W.	25.0	32.0 ♂	2	1.2895	-67	29	0.2531
"	"	41.0 ♂	1	1.3672	-63	39	0.3552
"	26.3	34.0 ♂	"	1.2031	-73	24	0.1596
"	25.0	40.0 ♀	"	1.5844	-78	32	0.2606
"	26.3	35.5 ♀	"	1.7269	-68	33	0.2445
1M.	27.5	38.0 ♂	"	1.6375	-72	27	0.1270
"	"	36.0 ♂	"	1.4434	-88	"	0.1441
"	29.3	39.0 ♀	"	1.4896	-72	29	0.1458
"	27.5	32.5 ♀	2	2.6447	-83	30	0.1234

TABELLE I. (Fortsetzung).

Nach d. Ausbrüt.	Temp. °C	K. gew. g	Zahl d. Embryo-nen	Frisch. Subst. g	Halb-stufenp. mV	Kurven-höhe mm	Cu mg in 100 g Fr. Sub.
1½ M.	28.6	480 ♂	1	8.41	-72	53	0.1436
"	"	380 ♂	"	5.95	-77	44	0.1527
"	"	400 ♂	"	7.72	-73	48	0.1386
"	"	320 ♀	"	7.01	-71	38	0.1269
"	"	290 ♀	"	8.80	-78	36	0.0917
"	"	320 ♀	"	8.13	-73	34	0.0885
erwachsen	10.5	3170 ♂	"	5.89	-57	21	0.0850
"	"	3120 ♂	"	7.09	-39	21	0.0739
"	"	1810 ♀ *	"	13.15	-52	65	0.3771
"	"	1700 ♀ *	"	12.61	-53	47	0.2511
"	24.3	2500 ♀ *	"	13.13	-74	38	0.0699
"	"	2270 ♂	"	12.22	-95	49	0.1126

* Eier reif.

TABELLE II. (Zusammenfassung d. TABELLE I).

Bebrütungsdauer T	Cu mg in 100 g Fr. Subst.		
	♂	♀	Insgesamt
9			0.5321
11			0.5114
13			0.3584
15			0.3840
17	0.4229	0.4045	0.4137
19	0.2998	0.3132	0.3042
21	0.3073	0.2899	0.2981
Nach der Ausbrütg.			
1 T.		0.3035	0.3035
2 "	0.3640	0.2630	0.3034
1 W.	0.2559	0.2525	0.2546
½ M.	0.1355	0.1346	0.1350
1½ "	0.1449	0.1023	0.1236
erwachsen	0.0905	0.2327	0.1616

TABELLE III. (Fe-Gehalt im Blut der Hühnerembryonen).

Bebrüt. dauer Tage	Temp. °C	K. gew. g	Zahl d. Embryo- nen	Frisch. Subst. g	Halb- stufenp. mV	Kurven- höhe mm	Fe mg in 100 g Fr. Sub.
9	28.5	2.3	1	0.0762	-194	87	66.272
"	"	"	"	0.0925	-233	75	45.243
11	28.7	4.75	"	0.0729	-213	89	71.330
"	"	"	"	0.0852	-227	96	67.723
13	29.0	9.3	"	0.0892	-145	64	73.991
"	"	"	"	0.1128	-235	101	52.615
15	27.5	14.0	"	0.1245	-210	94	44.176
"	"	"	"	0.1167	-199	85	41.558
17	27.3	21.7	"	0.1365	-194	103	45.238
"	29.3	"	"	0.1386	-156	79	62.049
"	"	"	"	0.0989	-162	80	88.978
19	30.0	39.2 ♂	"	0.0943	-189	122	78.700
"	"	" ♂	"	0.1888	-136	68	37.764
"	"	42.5 ♀	"	0.1767	-149	77	47.707
"	"	" ♀	"	0.1566	-180	62	40.229
21	21.8	35.5 ♂	"	0.0724	-241	101	87.707
"	22.0	" ♂	"	0.1307	-161	87	40.550
"	29.3	36.9 ♂	"	0.0977	-172	120	74.718
"	29.5	38.0 ♀	"	0.0837	-179	86	58.242
"	"	34.0 ♀	"	0.1595	-184	113	42.476
"	29.3	" ♀	"	0.0748	-187	96	74.197
"	28.0	36.0 ♀	"	0.0776	-239	111	86.984

Nach der Ausbrütung

2 T.	24.5	27.0 ♂	1	0.1010	-216	74	82.475
"	22.7	38.5 ♂	"	0.0884	-160	99	70.290
"	29.0	35.0 ♂	"	0.1107	-185	81	40.424
"	24.5	30.0 ♀	"	0.1565	-252	82	61.150
"	24.5	29.0 ♀	"	0.0812	-253	95	70.812
"	"	28.0 ♀	"	0.1003	-306	73	41.226
"	29.0	34.0 ♀	"	0.0949	-229	97	59.536
1 W.	27.0	41.0 ♂	"	0.1292	-206	78	68.111
"	28.7	34.0 ♂	"	0.1299	-228	97	44.457
"	27.0	40.0 ♀	"	0.1447	-198	64	46.993
"	21.7	39.5 ♀	"	0.1158	-228	62	60.017
"	28.7	33.0 ♀	"	0.0516	-262	112	79.651
½ M.	27.4	35.0 ♂	"	0.1590	-135	71	48.867
"	"	39.0 ♂	"	0.2311	"	86	43.098

TABELLE III. (Fortsetzung).

Nach d. Ausbrüt.	Temp. °C	K. gew. g	Zahl d. Embryonen	Frisch. Subst. g	Halbstufenp. mV	Kurvenhöhe mm	Fe mg in 100 g Fr. Sub.
$\frac{1}{2}$ M.	27.4	33.0 ♀	1	0.2631	-137	87	38.008
"	"	39.0 ♀	"	0.2182	"	80	41.704
"	28.6	" ♀	"	0.1113	-231	94	49.775
$1\frac{1}{2}$ M.	27.5	480 ♂	"	0.2042	-186	64	33.300
"	"	380 ♂	"	0.5540	-188	96	30.866
"	"	480 ♂	"	0.4899	-157	84	29.699
"	"	320 ♀	"	0.5115	-204	136	33.431
"	"	290 ♀	"	0.2882	-264	75	28.799
"	"	320 ♀	"	0.4140	-242	125	37.681
erwachsen	6.0	3170 ♂	"	0.348	-36	100	43.391
"	8.0	3120 ♂	"	0.406	-106	114	41.626
"	"	1550 ♀	"	0.634	-100	125	29.650
"	12.5	1700 ♀	"	0.440	-106	80	24.318
"	24.3	2510 ♀	"	0.2626	-133	70	29.714
"	"	2270 ♂	"	0.2444	-129	117	54.214

TABELLE IV. (Zusammenfassung d. TABELLE III).

Bebrütungsdauer T	Fe mg in 100 g Fr. Subst.		
	♂	♀	Insgesamt
9			55.757
11			69.526
13			63.303
15			43.127
17			65.421
19	58.232	43.968	51.100
21	67.658	65.474	66.410
Nach d. Ausbrütg.			
2 T.	64.396	58.181	60.844
1 W.	56.284	62.220	59.845
$\frac{1}{2}$ M.	45.982	43.162	45.290
$1\frac{1}{2}$ M.	31.288	33.303	32.296
erwachsen	46.410	27.894	37.152

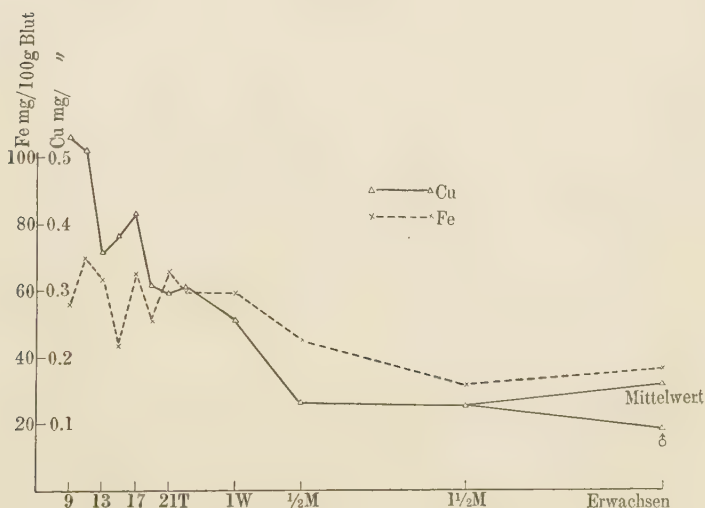
TABELLE V. (Fe/Cu-Index).

Bebrütungsdauer T	Fe/Cu-Index		
	♂	♀	Insgesamt
9			105
11			136
13			177
15			112
17			158
19	194	140	168
21	220	226	223
Nach d. Ausbrütg.			
2 T.	177	221	201
1 W.	220	247	235
$\frac{1}{2}$ M.	339	321	335
$1\frac{1}{2}$ M.	216	326	261
erwachsen	513	117	230

Die oben erwähnten Ergebnisse wurden hier zusammengefasst.

Fig. 1. Die Veränderung von Kupfer und Eisen.

Fig. 1. Die Veränderung von Kupfer u. Eisen.



Das Kupfer erreicht das Maximum am 9ten Tage der Bebrütung, dann sinkt es schnell, und im ersten halben Monate nach der Ausbrütung besitzt es einen ziemlich konstanten Wert, dann zeigt es eine langsame Abnahme. Den minimalen Wert hat der männliche Erwachsene. Der Durchschnittswert für beide Geschlechter zeigt bei erwachsenen Hühnern eine leichte Zunahme.

Der Eisengehalt bleibt ziemlich konstant vor der Ausbrütung. Bald danach sinkt er langsam, und gegen Ende von $1\frac{1}{2}$ Monaten nach der Ausbrütung erreicht er den minimalen Wert. Ausnahmsweise sieht man leichte Steigerung bei erwachsenen Hühnern.

Fig. 2. Kupfergehalt und Geschlechtsunterschiede.

Einen halben Monat nach der Ausbrütung ist kein geschlechtlicher Unterschied zu sehen. Einen weiteren Monat lang übertrifft das männliche Geschlecht, bei den Erwachsenen alsdann das weibliche Geschlecht.

Fig. 2. Kupfergehalt u. Geschlechtsunterschiede.

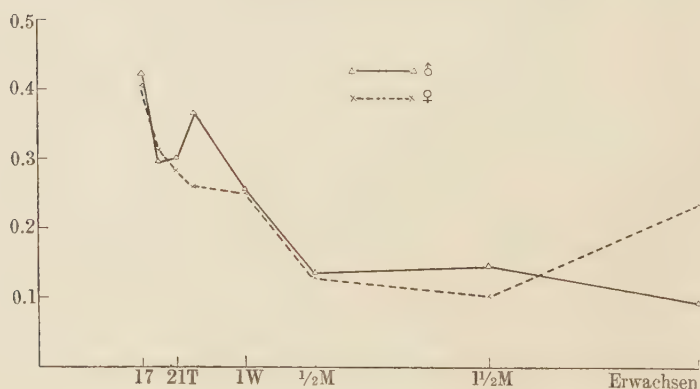


Fig. 3. Eisengehalt und Geschlechtsunterschiede.

Bis $1\frac{1}{2}$ Monate nach der Ausbrütung findet sich kein geschlechtlicher Unterschied. Bei den Erwachsenen zeichnet sich das männliche Geschlecht aus.

Fig. 3. Eisengehalt u. Geschlechtsunterschiede.

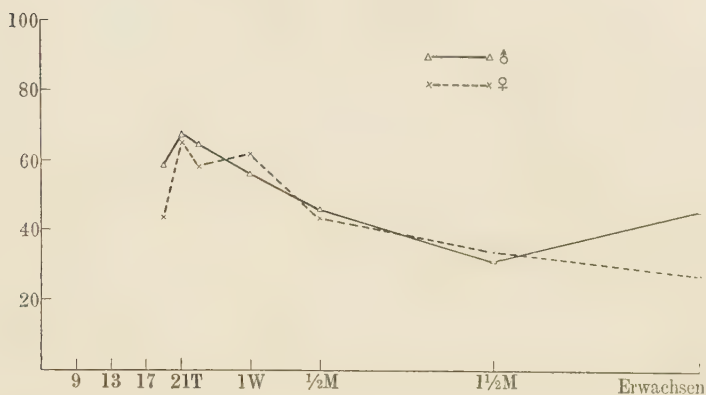


Fig. 4. Fe/Cu-Index.

Vom 9ten Tage bis $\frac{1}{2}$ Monat nach der Ausbrütung sieht man eine Zunahme. $1\frac{1}{2}$ Monate nach der Ausbrütung beginnt eine leichte Abnahme. Bei den erwachsenen Hühnern ist noch eine weitere Abnahme feststellbar. Die Werte für das männliche Geschlecht weisen eine grosse Zunahme auf.

Fig. 4. Fe/Cu-Index.

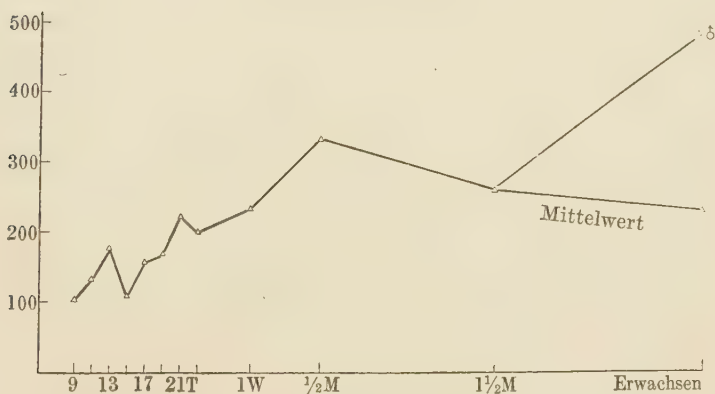
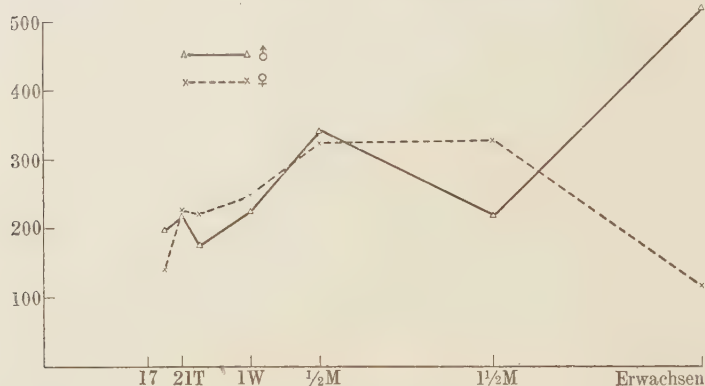


Fig. 5. Fe/Cu-Index und Geschlechtsunterschiede.

Bis $\frac{1}{2}$ Monat nach der Ausbrütung bemerkt man keine

geschlechtlichen Unterschiede. In einigen Beispielen wurde eine starke Zunahme beim männlichen Geschlecht beobachtet, dagegen eine deutliche Abnahme beim weiblichen. $1\frac{1}{2}$ Monate nach der Ausbrütung tritt eine Abnahme beim weiblichen Geschlecht auf.

Fig. 5. Fe/Cu-Index u. Geschlechtsunterschiede.



DISKUSSION.

Bezüglich des Eisengehaltes während der Entwicklung fand Nakayama und Inoue (1929) im Blut 101,0 mg% Eisen in männlichen, und 105,6 mg% Eisen in weiblichen menschlichen Neugeborenen im Vergleich zu 66,3–66,8 mg% in den Gebärenden. Nach Sachs u. a. (1936) fand sich in den Neugeborenen der Eisengehalt des Blutes als 51,79 mg%, im Alter von $\frac{1}{2}$ Monaten bis zu 15 Jahren als 40,51 mg%. Ein geschlechtlicher Unterschied ist bis zu 15 Jahren nicht vorhanden. Der durchschnittliche Gehalt bei den Erwachsenen ist nach ihnen 50 mg% und 45 mg% für Männer und Frauen. Der Eisengehalt sinkt gleich nach der Geburt, erreicht das Minimum im Alter von $\frac{1}{2}$ Monat, und steigt von 15 Jahren an zum zweiten Male.

Verfasser bekam die gleichen Resultate. Der Eisengehalt nimmt nach Ausbrütung zuerst bis $1\frac{1}{2}$ Monate ab, dann folgt eine Steigerung. Der geschlechtliche Unterschied ist bis zu $1\frac{1}{2}$ Monaten der Entwicklung nicht bemerkbar.

Die Gehaltsbestimmung des Kupfers in der Embryonalzeit wurde stets an der Leber ausgeführt, wobei es den Gehalt der Erwachsenen immer übertrifft. Das Kalb im Alter von 5 Tagen enthält nach McHargue (1925) 100 mg Cu pro kg frischer Substanz von Leber, der Ochse 12,5%. Ein totgeborenes Kalb hat nur 16,3 mg, das Kupfer vermindert sich also allmählich mit der Entwicklung. Nach Cunningham (1931), ergab die Analyse der Leber in bezug auf Kupfer eine schnelle Senkung des Kupfers beim Schaf, Hund, Meerschweinchen u. a. Die Untersuchung von Sachs u. a. über den Kupfergehalt des Blutes zeigt bei Neugeborenen 0,083 mg%, im Alter von $\frac{1}{2}$ Monat bis 15 Jahren durchschnittlich 0,171 mg%, und bei Erwachsenen eine nochmalige Senkung 0,131–0,132 mg%, das Maximum liegt im Alter von 2 Jahren.

Die Ergebnisse des Verfassers sind etwas verschieden von diesen. Die Abnahme setzt sich bis nach der Ausbrütung fort, ihr Maximum liegt im Alter von 2 Monaten, und danach kommt eine geringe Abnahme. Früher, als einen halben Monat nach der Ausbrütung konnte man geschlechtliche Unterschiede nicht konstatieren.

Die Hühnchen von $1\frac{1}{2}$ Monaten wurden von der landwirtschaftlichen Versuchsanstalt zu Isahaya bezogen, befinden sich also nicht unter ganz denselben Bedingungen. Die abweichenden Resultate z. B. der geschlechtlichen Unterschiede an Kupfergehalt, wobei das männliche Geschlecht das andere übertrifft, und die geringeren Werte im Fe/Cu-Index beim männlichen Geschlecht, können vermutlich auf die verschiedene Ernährung und dgl. zurückgeführt werden. Die starke Zunahme von Kupfer beim weiblichen Geschlechte und die Abnahme des Fe/Cu-Index mag natürlich auf die dabei herrschende Legezeit bezogen werden.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die Beziehung von Eisen und Kupfer im Blut wurde ontogenetisch beobachtet, bei Hühnern und Hühnerembryonen:

1. Beide Metalle nehmen mit der Entwicklung ab; das Kupfer zeigt aber eine schnellere Senkung.

2. Bei Embryonen und Hühnchen sind keine Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern nachweisbar.

3. Der Fe/Cu-Index steigt allmählich mit der Entwicklung. Bei Embryonen und Hühnchen sieht man für den Fe/Cu-Index ebenso keinen geschlechtlichen Unterschied.

LITERATUR.

- Cunningham, I. J. (1931): *Biochemic. J.*, **25**, 1267.
McHargue, J. S. (1925): *Amer. J. Physiol.*, **72**, 583.
Nakayama, S. und S. Inoue (1929): *J. Kinki Gynecolog. Soci.*, **12**, 519.
Sache, A., V. E. Levine und A. A. Fabian (1936): *Arch. int. Med.*, **58**, 583.

ÜBER DAS KUPFER IM ORGANISMUS, BEOBACHTET VOM STANDPUNKT SEINES PHYLOGENETISCHEN, ONTOGENETISCHEN UND GESCHLECHTLICHEN UNTERSCHIEDS AUS.

IV. Mitteilung:

Das Verhältnis von Kupfer und Eisen im Pflanzengewebe.

VON

SATORU KAMEGAI.

*(Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Fakultät zu Nagasaki.
Direktor: Prof. Dr. D. Ogata.)*

(Eingegangen am 9. Januar 1939)

EINLEITUNG.

Um das Verhältnis zwischen Kupfer und Eisen im Tierreich klarzustellen, bestimmte Verfasser ihren Gehalt im Blut von verschiedenen Tierarten. Die Erfolge lauten so, dass in den phylogenetisch niedrig gestellten Tierarten das Kupfer in den Vordergrund tritt, und mit dem Höhersteigen in der Systematik das Eisen seine Stelle einnimmt.

Bei den ontogenetischen Versuchen mit Hühnern kommt man zu einem ähnlichen Schluss, d. h. am Anfang der Entwicklung scheint das Kupfer hauptsächlich zu wirken, und mit der Entwicklung spielt das Eisen eine immer wichtigere Rolle. Verfasser ist also der Meinung, dass im Blut des Tieres diese beiden Elemente sich einigermassen miteinander kompensieren können. Der Vergleich beider Geschlechter ergab, dass im weiblichen Geschlecht das Kupfer und im männlichen Geschlecht das Eisen funktionell überwiegt. Verfasser hat dieselben Untersuchungen auf das Pflanzenreich hin weiter ausgedehnt. Der Spinat wurde dabei als Material benutzt, also ein diözische Pflanze.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. *Versuchsmaterial.*

Es wurden je 7 Paare aus beiden Geschlechtern herausgenommen, und der Kupfer resp. Eisen-Gehalt in Blättern, Stämmen, männlichen und weiblichen Blüten getrennt bestimmt. Die Blüten beider Geschlechter wurden von einigen Pflanzen gesammelt. Die weibliche Blüte war zu jung und als Ersatz wurden die reifen Samen, die im vorigen Jahre gesammelt und schon ziemlich trocken sind, gleichzeitig gebraucht.

2. *Die Methode der Bestimmung.*

Wie in den oben berichteten Versuchen wurde die polarographische Bestimmung angestellt.

3. *Die Verfertigung des Versuchsmaterials.*

Die Verfertigung des Versuchsmaterials geschieht ebenso wie in den vorangehenden Mitteilungen, doch soll sie hier kurz zusammengefasst werden. Die Veraschung wurde im elektrischen Ofen ausgeführt. Die Asche wurde dann in HNO_3 gelöst, und zu ihr wurde nach Abdampfen überschüssiges Ammoniak zugesetzt, so dass das Kupfer aufgelöst wird. Das Filtrat wird abermals verdampft und nach dem Trocknen nochmals ein wenig HNO_3 zugesetzt, nach Abtrocknen in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Agarlösung gebracht; diese letztere Lösung wurde polarographisch behandelt. Der Niederschlag wurde durch Na-Oxalaturn von Calcium befreit und dann zur Bestimmung appliziert.

RESULTATE.

Die auf obige Weise gewonnenen Resultate wurden auf mg in 100 g frischer Substanz umgerechnet. Siehe Tabelle I–IX und Fig. 1.

Aus diesen Ergebnissen schliesst man wie folgt.

1. *Kupfer:*

Die individuellen Schwankungen der Werte waren ziemlich

TABELLE I a. (Cu-Gehalt im Blatt) ♂.

Nr.	Frisch. Subst. g	Halb- stufenp. mV	Kurven- höhe mm	Cu mg in 100 g Fr. Sub.	Temp. °C
1	20	-60	19	0.0118	19.5
2	"	-54	30	0.0613	"
3	"	-49	20	0.0179	19.0
4	"	—	—	—	—
5	"	-39	41	0.1124	17.5
6	18	-60	20	0.0210	16.3
7	20	-49	50	0.1520	18.0

Mittel

0.0628

TABELLE I b. (Cu-Gehalt im Blatt) ♀.

1	16	-60	29	0.0576	19.5
2	20	-61	31	0.0331	19.7
3	15	-63	25	0.0260	"
4	"	—	—	—	"
5	"	-47	43	0.1265	17.0
6	"	-55	38	0.1020	16.3
7	18	-57	53	0.1959	16.0

Mittel

0.0903

TABELLE II a. (Cu-Gehalt im Stamm) ♂.

Nr.	Frisch. Subst. g	Halb- stufenp. mV	Kurven- höhe mm	Cu mg in 100 g Fr. Sub.	Temp. °C
1	20	-27	29	0.0234	18.3
2	"	-53	36	0.0347	19.6
3	"	"	26	0.0243	16.3
4	"	-54	24	0.0171	19.0
5	"	-58	16	—	17.5
6	"	—	—	—	—
7	"	-68	48	0.0851	17.0

Mittel

0.0349

TABELLE II b. (Cu-Gehalt im Stamm) ♀.

1	20	-58	37	0.0386	18.3
2	"	-60	33	0.0314	"
3	"	-56	17	0.0016	19.0
4	"	-51	20	0.0080	"
5	"	-68	17	0.0032	16.3
6	"	-53	34	0.0416	17.0
7	"	-52	40	0.0690	16.0

Mittel

0.0276

TABELLE III. (Cu-Gehalt in Fortpflanzungsapparat).

	Frisch. Subst. g	Halb- stufenp. mV	Kurven- höhe mm	Cu mg in 100 g Fr. Sub.	Temp. °C
Blüte (♂)	15.0	-61	56	0.2551	16.0
Samen (unreif)	"	-58	45	0.1792	17.0
" (reif)	15.4	-57	65	0.2843	19.0

TABELLE IV. (Zusammenfassung d. TABELLE I, II, III.)

	Cu mg in 100 g Fr. Sub.	
Blatt	♂ 0.0628	♀ 0.0903
Stamm	" 0.0349	" 0.0276
Fortpf. a.	" 0.2551	" 0.1792 (unreif)
		" 0.2843 (reif)

TABELLE V a. (Fe-Gehalt im Blatt) ♂.

Nr.	Frisch. Subst. g	Halb- stufenp. mV	Kurven- höhe mm	Fe mg in 100 g Fr. Sub.	Temp. °C
1	20	-258	94	0.5850	19.3
2	"	-266	180	1.2500	"
3	"	-256	172	1.1875	"
4	"	—	—	—	—
5	"	-264	113	0.7375	"
6	18	-262	183	1.4055	19.6
7	20	-220	101	1.9895	20.5

Mittel

1.1925

TABELLE V b. (Fe-Gehalt im Blatt) ♀.

1	16	-263	99	0.7893	20.5
2	20	-274	143	0.9675	20.0
3	15	-295	206	1.8786	"
4	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—
6	20	-272	77	0.4650	20.0
7	18	-268	64	0.8111	19.4

Mittel

0.9823

TABELLE VI a. (Fe-Gehalt im Stamm) ♂.

Nr.	Frisch. Subst. g	Halb- stufenp. mV	Kurven- höhe mm	Fe mg in 100 g Fr. Sub.	Temp. °C
1	20	—322	29	0.4800	19.0
2	„	—263	36	0.3750	„
3	„	—247	23	0.2625	„
4	„	—248	34	0.5658	„
5	„	—220	41	0.9375	„

Mittel

0.5241

TABELLE VI b. (Fe-Gehalt im Stamm) ♀.

1	20	—268	30	0.1040	20.0
2	„	—259	39	0.1415	„
3	—	—	—	—	—
4	20	—273	67	0.3885	20.0
5	„	—264	54	0.2935	19.0
6	„	—278	234	1.1600	21.0
7	„	—266	40	0.1800	19.0

Mittel

0.4613

TABELLE VII. (Fe-Gehalt in Fortpflanzungsapparat).

	Frisch. Subst. g	Halb- stufenp. mV	Kurven- höhe mm	Fe mg in 100 g Fr. Sub.	Temp. °C
Blüte(♂)	15.0	—138	57	3.7500	20.5
Samen(unreif)	„	—267	98	0.8320	„
„ (reif)	15.4	—262	75	0.5838	„

TABELLE VIII. (Zusammenfassung d. TABELLE V, VI, VII.)

	Fe mg in 100g Fr. Sub.	
	♂	♀
Blatt	1.1925	0.9823
Stamm	„ 0.5241	„ 0.4613
Fortpf. a.	„ 3.7500	„ 0.8320 (unreif)
		„ 0.5838 (reif)

Fig. 1. Kupfer-u. Eisengehalt im Pflanz.g.

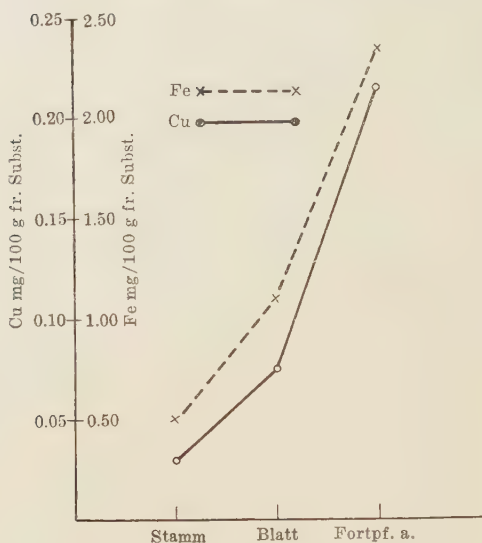


TABELLE IX. (Zusammenfassung d. TABELLE IV u. VIII.)

	Cu			Fe		
	♂	♀	Insgesamt	♂	♀	Insgesamt
Blatt	0.0628	0.0903	0.0765	1.1925	0.9823	1.0970
Stamm	0.0349	0.0276	0.0307	0.5241	0.4613	0.4898
Fortpf. a.	0.2551	0.1792	0.2172	3.7500	0.8320	2.3410
	0.2843 (reif)			0.5838 (reif)		

gross, so dass der Vergleich unter ihnen nicht ganz leicht ist. Im grossen und ganzen aber enthält der Stamm das wenigste Kupfer, die Blätter die doppelt so grosse Menge und die Blüte etwa 7 mal so viel.

In Bezug auf das Geschlecht überwiegt bei Blättern das weibliche Geschlecht, bei Stämmen und Blüten das männliche Geschlecht an Kupfergehalt. Die reifen Samen zeigen den höchsten Wert.

2. Eisen:

Sowohl Eisen wie Kupfer fand sich im Stamm am wenigsten. In den Blättern doppelt so viel, und in den Blüten zirka 5 fach so viel. Bezüglich des Geschlechts übertrifft das männliche Geschlecht das andere. In Stämmen ist der Unterschied keineswegs gross, in Blüten am grössten. In den reifen Samen ist das Eisen eher wenig enthalten.

DISKUSSION.

Maquenne (1920) fand, dass das Kupfer sich in allen Teilen der Pflanze findet. Die Keime und die neuen Blätter, wo der Stoffwechsel lebhaft ist, besitzen verhältnismässig viel gegenüber anderen Teilen. Quartaroli (1928) bemerkte, dass im Samen der Pflanzen Kupfer in grosser Menge vorhanden ist. Er vermutet, dass Kupfer bei der Oxydation als Aktivator wirkt, und auf diese Weise die Reaktion regelt. Es hat die Stelle von Vitamin in der tierischen Ernährung.

Über die Beziehung zwischen Kupfer und Chlorophyll gibt es keine bestimmte Meinung. McHargue und Calfee (1933) beobachteten das Kupfer als notwendig für grüne Pflanzen. Tuyuno (1937) ist der Meinung, dass der Umstand noch nicht ganz klar ist. Die Untersuchung von Cunningham (1931) mit verschiedenen Pflanzenarten in verschiedenen Teilen ergaben, dass die chlorophyllreicheren äusseren Blätter nicht immer mehr Kupfer enthalten als die chlorophyllärmeren inneren Blätter. In den Kohlblättern hat Sarata (1937) gefunden, dass der Kupfergehalt der äusseren Blätter nach innen graduell sich vermindert.

Nach Verfassers eigenen Untersuchungen sind die Blätter reicher an Kupfer als die Stämme. Die Menge des Kupfers geht aber nicht immer parallel mit der des Chlorophylls. Im allgemeinen enthalten die Pflanzen eine grössere Menge von Kupfer in ihrer Blütezeit.

Muckenhirn (1936) konnte das Wachstum von Pflanzen durch Zufuhr von Kupfer, Mangan und Zink fördern. Unter diesen wirkt das Kupfer am stärksten. Nach Sarata (1937)

zeigen die Blätter von *Paeonia Moutan* eine Schwankung in dem Kupfergehalt; Kupfer fand sich am meisten in der Blütezeit, dann sinkt es allmählich, im September den niedrigsten Wert aufweisend. Die Blüten und die Keime sind sehr reich an Kupfer; die Blüten, Staubblätter speichern in sich das Kupfer mit der Entwicklung. In den Fruchtknoten vermehrt sich das Kupfer bis Anfang Juli.

Verfassers Befunde sind ähnlich. In der Blütezeit, wo der Stoffwechsel am lebhaftesten ist, enthält die Blüte eine grosse Menge von Kupfer. Ihr folgt das Blatt, und der Stamm hat das wenigste Kupfer.

Für das Verhältnis von Kupfer und Eisen herrscht aber bis jetzt keine bestimmte Meinung. Einige Forscher sind der Anschauung, dass Kupfer bei der Oxydation von Ferro-Verbindungen als Katalysator wirkt und dadurch die Vergiftung beseitigt. Tati (1934) fand, dass die Wurzeln, in denen Kupfer reichlich enthalten ist, gleichzeitig eine grosse Menge von Eisen besitzen. Diese Tatsache weist auf einen funktionellen Zusammenhang hin.

In Verfassers Ergebnissen ersieht man beinahe gleiche Verhältnisse. So haben Kupfer und Eisen sicherlich eine innige Beziehung zueinander.

ZUSAMMENFASSUNG.

Verfasser untersuchte den Zusammenhang von Kupfer und Eisen im Pflanzenkörper. Die Stämme, Blätter und Fortpflanzungsapparate des Spinats wurden einzeln auf ihren Kupfer- resp. Eisen-Gehalt durch Polarograph quantitativ untersucht.

1. Kupfer und Eisen wurden in gleichem Verhältnis enthalten gefunden. Der Fortpflanzungsapparat enthält die grösste Menge, ihm folgen die Blätter und zuletzt kommt der Stamm.

2. Der Stoffwechsel hat ohne Zweifel einen innigen Zusammenhang mit dieser Verteilung. Die lebhaft funktionierende Blüte hat den höchsten Gehalt.

3. Das Geschlecht übt einen Einfluss aus. Trotz grosser Schwankung kann man ohne weiteres sehen, dass beim männlichen Geschlecht das Eisen, und beim weiblichen Geschlecht das Kupfer

überwiegt.

SCHLUSS.

Aus Mitteilungen I–IV schliesst Verfasser folgendes.

1. Das Blut des Tieres enthält Kupfer in verschiedenen Mengen. Je niedriger das Tier, dem das Blut entnommen wird, in der Systematik steht, desto mehr Kupfer ist zu finden. Beim Eisen besteht ein umgekehrtes Verhältnis.

2. Diese Verhältnisse sind auch in der ontogenetischen Entwicklung zu sehen. Am Anfang der Entwicklung scheint das Kupfer eine wichtigere Rolle zu spielen. Mit der Entwicklung aber tritt das Eisen allmählich in den Vordergrund.

3. In der Pflanzen ist die Verteilung von Kupfer und Eisen parallel, d. h. wo das Kupfer reichlich vorhanden ist, da ist auch das Eisen in grosser Menge enthalten.

4. Sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen überwiegt beim weiblichen Geschlecht das Kupfer und beim männlichen das Eisen.

Zum Schlusse möchte Verfasser Herrn Prof. D. Ogata, Herrn Prof. K. Kiyohara und Herrn Prof. T. Kawakami für ihre stetige Leitung den herzlichsten Dank aussprechen. Auch hält Verfasser es für seine angenehme Pflicht Herrn Prof. M. Sikata und Herrn Prof. I. Tati für ihr weitgehendes Entgegenkommen in der polarographischen Technik seinen wärmsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Cunningham, I. J. (1931): *Biochemic. J.*, **25**, 1267.
Maquenne, L. und E. Demoussy (1920): *C. r. Acad. Sci. Paris*, **170**, Nr. 2, 87; (1920): Zitiert aus *Ber. Physiol. usw.* **1**, 38.
McHargue, J. S. und R. K. Calfee (1933): *Plant Physiol.*, **8**, 305; (1933): Zitiert aus *Ber. Physiol. usw.* **74**, 653.
Muckenhirn, R. J. (1936): *J. amer. Soc. Agronomy*, **28**, 824.
Quartaroli, A. (1928): *Chem. Abst.*, **22**, 2387.
Sarata, U. (1937): *Jap. J. med. Sci.-Biochem.*, **3**, 197.
„ (1937): *Ebenda*, **3**, 207.
Tati, I. (1934): *Nippon Nogeikagaku Kaisi*, **10**, 368.
Tuyanno, K. (1937): *Okayama Igk. Z.*, **39**, 1.

ISOLATION OF CHOLEIC ACID FROM DOG BILE.

By

GEORGE SABA.

*(From the Biochemical Laboratory of the "Nippon" Medical School, Tokyo.
Director: Prof. Dr. K. Kазиро.)*

(Received for publication, January 26, 1939)

This paper is written to report the isolation of margaric choleic acid as a pure crystalline substance from dog bile, thereby solving the nature of Hammarsten's "choleic" acid in dog bile.

In 1904, Hammarsten found that there are two kinds of taurocholic acid in dog bile, one of which is different from ordinary taurocholic acid, and he supposed this to be "taurocholeic" acid. But he could not make a further study on the construction of the acid, because of insufficient quantity of material. In his time, the chemical knowledge of the bile acids was not as well known as at present. Now that dog bile is so frequently used as the material for bile acid metabolism, it is extremely desirable that a reinvestigation be made of this compound, especially of its quantity. A number of Japanese workers, like Tanaka (1933), Kazuno and Yamasaki (1934) did some analysis on dog bile. Their investigations were, however, to study the chemical nature of taurocholic acid, and so the presence of desoxycholic acid in dog bile remained as yet undetermined.

In the present paper the writer takes up again the old problem from the viewpoint of choleic acid and its quantity. With more precise analytical investigation and colorimetric estimations, the writer arrived at the following conclusion, starting from about 150 ml summer bile of 28 gall-bladders of dogs: 1. There is a choleic acid in dog bile; 2. The acid is desoxycholic acid combined with margaric acid and; 3. The amount of the acid comes to about 1/20 of the cholic acid.

ANALYSIS.

150 ml of bile was heated with 300 ml of alcohol to the boiling point on the water bath, filtered from precipitated protein substance and brought to dryness in an evaporator under reduced pressure. The dried mass was dissolved in water and shaken with ether, first in alkaline, then in acid reaction. The alkaline ether fraction contains most of the neutral fat and cholesterol. The experiments were carried out only with this acid ether fraction and the water fraction.

A. Acid ether fraction.

The ether was distilled off and the residue was then treated with petroleum ether.

1) Petroleum ether fraction (fatty acids).

Scale-like crystals were obtained on evaporation of the solvent. The substance was purified by repeated recrystallization. The pure specimen melted at 58°C. The analysis shows the substance corresponds to margaric acid.

5.300 mg Substance, 9.160 mg CO ₂ and 3.710 mg H ₂ O.		
Calculated for C ₁₇ H ₃₄ O ₂	C 75.10	H 12.56
Found	75.25	12.50

2) Petroleum ether insoluble fraction (bile acids).

No precipitation was observed by adding barium chloride to the ammonium water solution of the substance. Therefore, desoxycholic acid seems to be absent here. The water soluble Ba-salt was then acidified with diluted HCl. The precipitation amounted to about 200 mg and gave a strong positive Yamasaki test. It was not crystallized. Seemingly there exists some crude mixture of conjugated cholic acids.

B. Water fraction.

This is the main fraction containing conjugated bile acid, and yielded free bile acids on hydrolysis. The fraction, together with its suspended precipitate, was neutralized by adding KOH solution,

then KOH grains were added until a 10% solution was obtained, then mixed and autoclaved at 130°C for 6 hours. Free acids were then obtained in crude form by acidifying with diluted HCl, then they were converted into their Ba-salts and divided in 2 fractions, into water soluble and insoluble.

1) *Water insoluble Ba-salts.*

The Ba-salts were converted into Na-salts, by boiling with sodium carbonate solution, then acidified with HCl after filtration. The free acids were then crystallized from diluted alcohol. Rosetten formed crystals of 551 mg in amount, which melted at 188°C after repeated recrystallization, and which revealed yellow to Liebermann's test and green to Kaziro-Shimada's benzaldehyde test (1938), all suggesting the presence of choleic acid. In the formylated compound, slender needles of m.p. 193°C showed no depression by mixing with pure formyldeoxycholic acid. By boiling with xylol, prismatic needles of m.p. 183°C were obtained. No depression of melting point was observed with pure xylol choleic acid.

3.580 mg substance, 9.835 mg CO₂ and 3.255 mg H₂O.

Calculated for (C₂₄H₄₀O₄)₂ + C₈H₁₀ C 75.50 H 10.11

Found 74.92 10.17

Identification of margaric acid was carried out by evaporating the remaining xylol. Scale crystals of m.p. 58°C, corresponding to margaric acid, were obtained.

2) *Water soluble Ba-salts.*

This is the cholic acid fraction. Isolation of the acid was carried out as in the usual procedure. The yield of purified material was 35.3 g. Cholic acid was easily identified from its melting point, specific colour reactions, etc.

C. Analysis of the Remaining Substances.

The total uncrystallizable amorphous residue from the above 2 fractions, which would possibly contain some unknown acids, weighed 3.6 g. The amount of cholic and desoxycholic acid in

this crude specimen were now determined by means of Shimada's new estimation method (1938, 1939) colorimetrically. This method is, because of its principle, the most reliable of all past methods reported. However, it is not applicable in cases in which a higher content of cholic acid might be present.

Results obtained are as follows:

Amount of cholic acid, determined by furfural method: 1.944 g. That of desoxycholic acid, determined by benzaldehyde method: 1.36 g. Therefore, the amount of unidentified acids calculated to 0.3 g.

SUMMARY OF ANALYSIS.

Cholic acid as	crystallized	35.3 g.
	amorphous	1.94
	total	37.24
Cholic acid as	crystallized	0.55
	amorphous	1.36
	total	1.91
Acid unidentified		0.3

DISCUSSION.

Except in Hammarsten's classical notes, the existence of desoxycholic acid in dog bile was only suggested recently by Kaziro and Shimada (1938) with the aid of their newly found special colour reaction to the acid. Former reports in the literature of the normal value of desoxycholic acid in dog bile are not reliable because they are all obtained by means of the indirect method of estimation.

As is seen by the above experiments the content of desoxycholic acid in dog bile is significantly lower than that of cholic acid. The ratio of both acids was found to be 1:20.

Some coincidental findings were obtained by another worker from this laboratory in the course of studies on the estimation method of bile acids. Shimada has already noted in his paper (Jl. of Biochem., 28, P. 171) regarding dog bile that "...kann die Säure unter Umständen in so geringer Menge auftreten, dass sie sich auch durch diese empfindlichste Nachweisreaktion noch

kaum nachweisen lässt." In most cases of dog bile, it was pointed out by Ohyama and Nagaki (yet unpublished report), that with the benzaldehyde test, desoxycholic acid cannot be verified in duet bile, and not always easily in bladder bile. As noted by Shimada (1939), a higher coexistence of cholic acid interferes with the colour reaction by contamination of a reddish colour. The limit ratio, desoxycholic acid: cholic acid, in which the green colour of the reaction can be well ascertained, may be about 1:10.

Nishikawa(1938) tried recently to demonstrate the existence of desoxycholic acid in dog bile and its normal value in duet bile. The method used in his experiments was the vanillin phosphoric acid method established by Abe (1937). In most cases in his experiments, the estimated values for desoxycholic acid are too high to be accepted as of real value, in spite of that the method applied here seems to be the most reliable one at present which permits a simultaneous estimation of cholic and total bile acid. Nagaki of this laboratory will shortly present a detailed discussion of the relative value of the vanilline-method and the benzaldehyde-method. It might be noted here, however, that the vanilline-method is not applicable to dog bile without preliminary hydrolysis. Otherwise a significantly lower value for cholic acid might be obtained and consequently a higher value for desoxycholic acid.

Doubulet (1936) had also suggested the existence of desoxycholic acid in dog bile, i.e., he determined the whole amount of bile acids by means of Schmidt-Dart's iron-precipitation-method (1921), and rendered the difference between the whole amount of bile-acids and the amount of cholic acid as the quantity of desoxycholic acid. But the iron-precipitation-method applied here, because of its principle, might apparently result in a too high value for the total acids, for that the data obtained on desoxycholic acid was relatively too high to be accepted as the normal quantity of desoxycholic acid in dog bile.

SUMMARY.

In order to obtain evidence as to the existence of desoxycholic acid in dog bile, a preparative analysis was carried out with 150 ml

of bile from 28 gallbladders.

Cholic acid and margaric choleic acid were obtained in crystallized form. Determined ratio of both acids was about 20:1.

Some discussion was presented on the findings reported in literature as to the amount of desoxycholic acid in dog bile.

REFERENCES.

- Abe, Y. (1937): *Jl. of Biochem.*, **25**, 181.
Doubulet, H. (1936): *Jl. biol. Chem.*, **114**, 289.
Hammarsten, O. (1904): *Z. f. physiol. Chem.*, **43**, 127.
Kaziro, K. and Shimada, T. (1938): *Z. f. physiol. Chem.*, **254**, 52.
Kazuno, T. and Yamasaki, K. (1934): *Z. f. physiol. Chem.*, **224**, 160.
Nishikawa, Y. (1938): *Igaku-Kenkyu*, **12**, 2385.
Schmidt and Dart (1921): *J. biol. Chem.*, **45**, 415.
Shimada, T. (1938, 1939): *Jl. of Biochem.*, **28**, 149 and **29**, 41.
Shimada, T. (1938): *Jl. of Biochem.*, **28**, 169.
Tanaka, T. (1933): *Z. f. physiol. Chem.*, **220**, 39.

DETERMINATION OF DEHYDROCHOLIC ACID.

By

GEORGE SABA.

(From the Biochemical Laboratory of the "Nippon" Medical School, Tokyo.
Director: Prof. Dr. K. Kaziro.)

(Received for publication, January 26, 1939)

In 1937, Kaziro and Shimada reported on the specific colour reaction of C_3 -ketone bile acids, such as dehydrocholic acid, with *m*-dinitrobenzene, based on the test for hormone estimation previously noted by Zimmermann (1935-1938). The specificity of the reaction to C_3 -ketone-group of bile acid was also verified by the writer (1939).

The author planned in the present experiment to establish a new determination method of dehydrocholic acid and other C_3 -ketone bile acids by applying the colour reaction, the purpose of which is to demonstrate the fate of C_3 -ketone bile acid administered in living tissue. In the process of experiments, the author noted that the colour reaction of bile acids is far more labile than that of androgene substances and that the original mode of operation must be modified to attain a more stable reaction for the present purpose.

The estimation method by the author is given in detail in the following paragraphs. It gives fairly accurate results by means of photometric determination of the colour obtained by the procedure presented.

I. PREPARATION OF REAGENTS.

1. Alcohol.

Ordinary commercial ethyl alcohol is used for the preparation of the following reagents. Methyl alcohol cannot be used, as it inhibits the colour reaction.

2. 0.5*n* alcoholic solution of potassium hydroxide.

4 grams of pure KOH grains are dissolved in 100 ml of diluted alcohol by shaking. An $0.5n$ solution is then prepared by titration with $0.1n$ oxalic acid solution. The reagent must be carefully kept from carbon dioxide. Otherwise, not only the reduced alkalinity, but the turbidity of potassium carbonate precipitated on adding more volume of alcohol, interferes with an accurate measurement.

3. *m*-Dinitrobenzene.

m-Dinitrobenzene must be purified for the reagent by repeated recrystallization from pure methanol. Thin needles of Mp. $91.5-92^{\circ}\text{C}$. 2 g/dl alcoholic solution is to be used, which gives a faintly yellowish colour.

II. MODE OF COLOUR DEVELOPMENT AND PHOTOMETRY.

As in Zimmermann's original method for hormone, the test solution, the *m*-dinitrobenzene solution and KOH-solution are pipetted out into a test tube in the proportion of $2:1:1\text{ ml}$, and mixed well. Then place the test tube in a water bath kept at a constant temperature, $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes. The pink coloured solution obtained is brought to the Pulfrich-Photometer. The solution must be perfectly clear before reading. Clear water is taken for control fluid.

The extinction curve obtained is shown in figure 1.

As seen in the figure, the maximum absorption lies near the wave length of 5300 \AA . Thus a filter S_{53} of the Pulfrich-photometer is to be used for the measurement of extinction values of each concentration of dehydrocholic acid. The range, in which Beer's law is available, is from 0.25 to 1.5 mg dehydrocholic acid per 2 ml alcoholic solution, as shown in figure 2. In these limits, the ratio $x : E - E_0$ is 3.8 .

So the x -value ($\text{mg}/2\text{ ml}$ dehydrocholic acid) is calculated from the formulae:

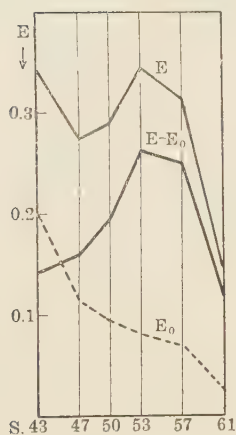
$$x = 3.8 \times (E - 0.081)$$

E the extinction value measured.

$E_0 = 0.081$ the extinction value of the blank test.

Fig. 1.

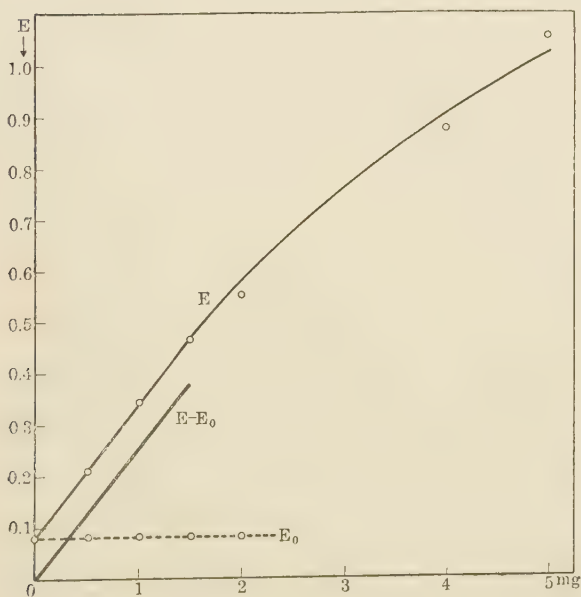
The extinction curve of 1 mg dehydrocholic acid.
(measured in 10 mm cuvette at 20°C)



S	E	E ₀	E-E ₀
43	0.343	0.201	0.142
47	0.276	0.114	0.162
50	0.290	0.094	0.196
53	0.343	0.081	0.262
57	0.316	0.068	0.248
61	0.143	0.025	0.118

Fig. 2.

Extinction values of each concentration of dehydrocholic acid.

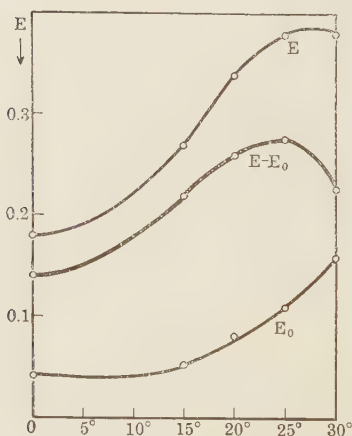


Xmg	E
5.00	1.066
4.00	0.879
2.00	0.552
1.00	0.345
0.50	0.212
0.25	0.145
0.00	0.081

III. THE INFLUENCE OF TEMPERATURE.

As shown in the following chart, the extinction value is highly influenced by the temperature of the water bath, in which the colour reaction is carried out. Hence the temperature of the water bath must be carefully kept constant throughout the whole course of the experiment. The maximal E value is obtained at 25°C . The author preferred, however, the temperature of $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, as the extinction value of the blank test is relatively low and constant in this temperature, and the highest and accurate value is obtained for the test substance.

Fig. 3.



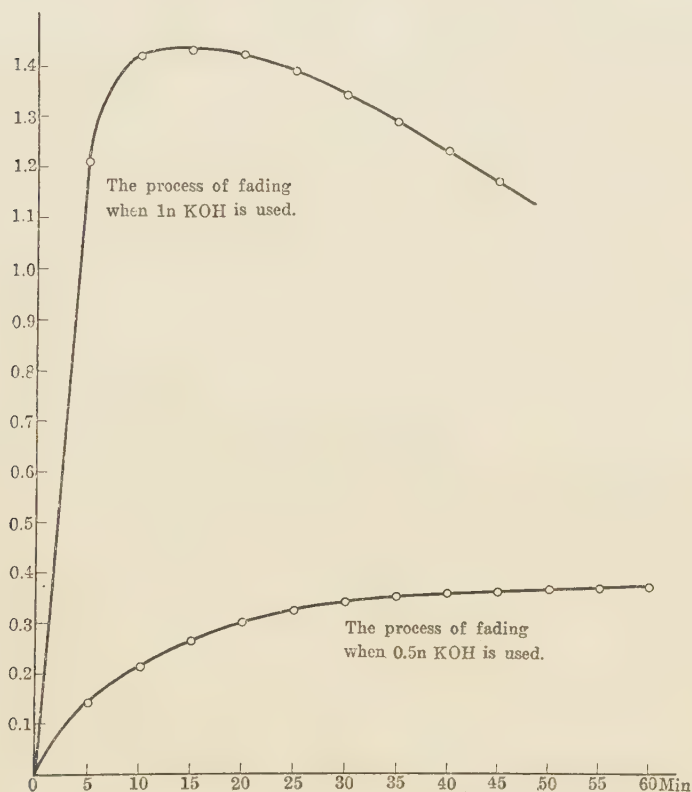
T (°C)	E	E ₀	E-E ₀
0°	0.181	0.041	0.140
15°	0.272	0.051	0.221
20°	0.343	0.081	0.261
25°	0.387	0.110	0.277
30°	0.387	0.161	0.226

IV. CONCENTRATION OF THE KOH SOLUTION.

$3n$ KOH is used as the reagent for the estimation of androgene zy Zimmermann, while a $2.5n$ solution is used by Callow, Callow and Emmens. In the case of bile acid, such a high alkalinity gives too rapid changes in the colour reaction, resulting in a prompt fading of the pink colour to a brownish one and is not satisfactory for photometric use. Even when $1n$ KOH is used, the colour fades too rapidly as is shown in figure 4. Using $0.5n$ solution, the author finally acquired a relatively stable colour, i.e.

the extinction value reaches the maximum after 30 minutes and remains at almost the same colour-strength for at least 30 minutes.

Fig. 4.



Hence it is noted, that the extinction values of C_3 -ketone-steroids, which were demonstrated by Zimmermann or Callow et al, were that of the colour which has already faded. It must be emphasized that C_3 -ketone bile acids also reveal a stable pretty pink colour when a lower concentration KOH solution is used.

V. THE EFFECT OF OTHER BILE ACIDS.

As Kaziro, Shimada and Saba noted, no bile acid is posi-

tive to the test except C_3 -ketone compounds. In fact the addition of cholic acid, desoxycholic acid or anthropodesoxycholic acid to the test material does not interfere with the actual extinction value of dehydrocholic acid.

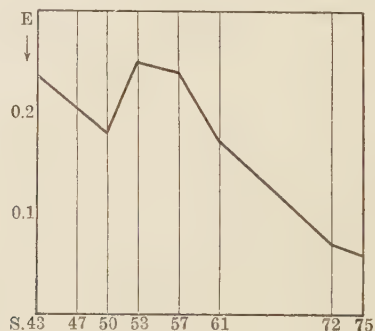
Among C_3 -ketone bile acids, tri-keto acid (dehydrocholic acid) and *di*-keto acid (dehydrodesoxy- and dehydroanthropodesoxycholic acid were examined as examples) are almost the same in colour strength, but that of C_3 -monoketone acid is about one tenth of the former.

VI. OTHER SUBSTANCES WHICH ARE POSITIVE TO THE TEST.

Acetone and creatinine are positive to the *m*-dinitrobenzene test, but the colour reaction of these compounds is very feeble and fades soon even when $0.5n$ KOH is used as the reagent.

l-Ascorbic acid and monosaccharides are also positive to the test, but their colour reaction is more bluish than that of the ordinary ketone bodies. The extinction curve of *l*-ascorbic acid is given in figure 5.

Fig. 5.
1 mg *l*-ascorbic acid, 10 mm cuvette, $20^\circ C$.



Polysaccharides and aliphatic aldehydes are negative to the test. The reducing disaccharides, as for example lactose, shows positive to the test. Glutathion and phenols are negative to the test.

VII. EXPERIMENT WITH TISSUE EXTRACT.

The alcoholic extract of animal tissue, i.e. of liver, is negative to the test. But tissue extract has its own colour, which naturally influences the extinction value of the test material. Hence, when tissue extract is added to the test substance, the extinction value measured is the sum of the value of its own colour and the actual value of the test material. Therefore the actual value of test material can be obtained by reducing the value of the tissue extract from the extinction value measured.

Added dehydrocholic acid could be refound from liver extract with satisfactory accuracy as is shown in an example of the experiments as follows:

1 mg dehydrocholic acid was added to 2 ml of alcoholic liver extract from rabbit.

E_1 (extinction value measured) = 1.401

E_2 (value of the colour of the tissue extract
itself as the blank test) = 1.056

$E_1 - E_2$ calculated = 0.345 mg dehydrocholic acid = 1.0

" found = 0.345 " " " = 1.0

The procedure used in practical estimation will be detailed in a further communication.

SUMMARY.

A new method is described for the determination of dehydrocholic acid as pure material and with tissue extract. The method is sufficiently accurate to be applicable to the determination of acid ranging from 0.25 to 1.5 mg.

REFERENCES.

- Callow, N., Callow, R. and Emmens, C. (1938): *Biochem. Jl.*, **32**, 1312.
 Kazi, K. and Shimada, T. (1937): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **249**, 220.
 Saba, G. (1939): *Jl. of Biochem.*, **29**, 371.
 Zimmermann, W. (1935): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **233**, 257.
 Zimmermann, W. (1938): *Klin. Wochschr.*, **32**, 1103.

ÜBER DIE MIKROBESTIMMUNG DER BLUT- PHOSPHATASE.

Von

HIROSHI FUJITA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 4. Februar 1939)

Die Bestimmung der Blutphosphatase ist bisher von vielen Forschern versucht worden. Alle Methoden beruhen darauf, die durch fermentative Hydrolyse des Glycerophosphats oder Phenylphosphats entstandene anorganische Phosphorsäure kolorimetrisch zu messen. Prinzipiell muss man dabei freilich unter derselben Bedingung einen Kontrollversuch anstellen, um den prozentualen Betrag der Substratspaltung zu berechnen. Er kann aber wohl umgangen werden, indem man einfach anorganisches Phosphat des betreffenden Blutes oder Serums misst und damit die nach bestimmter Zeit gefundene Phosphatsmenge korrigiert. Jedoch soll dabei vorausgesetzt werden, dass das zugesetzte Substrat und die im Serum oder Blut a priori vorhandene organische Phosphorverbindung fermentativ mit derselben Geschwindigkeit spaltbar sind oder dass das erstere leichter spaltbar und in grösserer Menge als die letztere vorhanden ist. So hat Bodansky (1933) seine Bestimmungsmethode der Serumphosphatase ausgearbeitet. Für diese Methode benötigt man wenigstens 1 ccm Serum. Bei der klinischen Blutuntersuchung wird aber oft ein Arbeitsverfahren mit noch weniger Blutmenge erwünscht sein.

1937 hat Ohmori eine neue Methode zur Phosphataseuntersuchung beschrieben. Die Methode beruht darauf, dass man das durch die Hydrolyse des *p*-Nitrophenolphosphats abgespaltene *p*-Nitrophenol kolorimetrisch misst. Die Gelbverfärbung des alkalisierten *p*-Nitrophenols ist auch in sehr verdünnter Lösung deutlich bemerkbar und dem Gehalt des freien *p*-Nitrophenols

proportional. Man kann daher mit einer sehr verdünnten Substratlösung arbeiten, und eine sehr geringe Menge Phosphatase ist schon ausreichend, um in kurzer Zeit eine genau messbare Hydrolyse zu erzielen.

Diese Eigenschaften der *p*-Nitrophenolverbindungen wurden zuerst von Morimoto (1937) zu Fermentstudien ausgenutzt, indem er *p*-Nitrophenolsulfat als Substrat der Sulfatase brauchte. *p*-Nitrophenolhexoside sind besonders geeignet zur Carbohydrasenforschung. Über die damit durchgeführten Untersuchungen bez. Glukosidase und Galaktosidase wird bei nächster Gelegenheit auch aus dem hiesigen Institut berichtet werden. Ausserdem ist das *p*-Nitrophenolphosphat viel leichter spaltbar als das Glycerophosphat und seine Spaltung wird, wie von Ohmori angegeben, durch die Anwesenheit des Glycerophosphats nicht gehemmt, falls seine Konzentration das Zweifache der *p*-Nitrophenolkonzentration nicht überschreitet.

Ich habe unter Leitung von Prof. Akamatsu ein Mikromethode der Phosphatasebestimmung ausgearbeitet, die mit 0.1 ccm Blut ausführbar ist und den Monoesterasegehalt von Erythrozyten und Plasma gesondert messen lässt. Die Erythrozytenmonoesterase wird bei PH 6.0 nach der Angabe von Ohmori unter Aktivierung mittels Citrats bestimmt und die Plasmamonoesterase bei PH 9.0 unter Magnesiumaktivierung. Die letztere wird durch Citrat nicht im geringsten beeinflusst.

A. Reagenzien.

1. Natrium *p*-Nitrophenolphosphat ($\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OPO}_3\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; M.G. 299) wird nach Ohmori hergestellt. Die Krystalle sind in einer tief blau gefärbten Flasche aufzubewahren. *M*/400 Lösung für Plasmauntersuchung und *M*/1000 Lösung für Erythrozytenuntersuchung werden bereitet, mit Toluol überschichtet und im Eisschrank aufbewahrt.

2. Neutrale Citratlösung zur Blutverdünnung. Der Gebrauch der 10% Handelseitratlösung für die Bluttransfusion ist bequem. Sie wird mit physiologischer Kochsalzlösung 10 fach verdünnt. Falls die käufliche Citratlösung nicht neutral reagiert,

muss sie vor der Verdünnung durch Alkalizusatz neutralisiert werden.

3. Verdünnte Citratpufferlösung für der Erythrozytenversuch. 0.1 M Citratgemisch (Söresen) von pH 6.0 wird mit gleichem Volumen destillierten Wassers verdünnt.

4. 0.1 M Glykokoll-Natronpuffer von pH 9.0 für den Plasma-
versuch. Sie wird bei Gebrauch mit gleichem Volumen $M/20$ Magnesiumchlorid gemischt.

5. 10% Trichloressigsäure.

6. Gesättigte Natriumcarbonatlösung.

B. Methodik.

Man saugt 0.1 ccm Blut in eine Kapillarpipette ein und lässt es in 5.0 ccm neutraler Citratlösung hineinfließen. Es soll keine Hämolyse auftreten. Man trennt dann durch Zentrifugieren die Erythrozyten und das verdünnte Plasma.

a) Monoesterase der Erythrozyten.

Man wäscht die abgeschleuderten Erythrozyten einmal mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung und suspendiert sie in 20 ccm verdünnter Citratpufferlösung (pH 6.0). Bei Mäuse- oder Rattenblut nimmt man vorteilhaft 40 ccm Pufferlösung, weil die Erythrozytenmonoesterase dieser Tiere hoch aktiv ist. Auf diese Weise kann man 200 resp. 400 fach verdünnte Suspension von Erythrozyten herstellen. Man erwärmt eine Zeit lang 5.0 ccm dieser Suspension auf 37° , darauf fügt man 5.0 ccm $M/1000$ p -Nitrophenolphosphat hinzu, das vorher ebenfalls auf 37° erwärmt wurde. Die Endkonzentration des Substrats ist also $M/2000$. Das Gemisch wird für eine Stunde in ein Wasserbad von 37° gestellt. Dann folgt Enteiweissung mit gleichem Volumen 10% iger Trichloressigsäure. 5.0 ccm Filtrat werden mit 4.0 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung versetzt und mit Wasser auf 10.0 ccm gefüllt. Kolorimetrie des freien p -Nitrophenols gegen eine alkalische p -Nitrophenollösung von bekannter Konzentration beendet die Untersuchung.

b) Monoesterase des Plasmas.

1.0 ccm Glykokollpuffer-Magnesiumchlorid-Gemisch erwärmt man vorher auf 37° und fügt 3.0 ccm oben erwähnten verdünnten Plasmas hinzu. Die Endkonzentration des Substrats beträgt $M/2000$ wie bei der Bestimmung der Erythrozytenmonesterase. Die Hydrolyse wird bei 37° fortgesetzt. Da die Lösung schon alkalisch reagiert, färbt sie sich, falls eine Hydrolyse stattfindet, allmählich gelblich. Nach zwei Stunden prüft man den Verfärbungsgrad. Nach paarmaliger Übung kann man gleich beurteilen, ob die Hydrolyse noch weitere 2 Stunden fortgesetzt werden soll. Zusatz eines Tropfens gesättigter Natriumcarbonatlösung unterbricht jede weitere Fermentwirkung und vertieft gleichzeitig den Farbgrad ein wenig. Es kann gleich kolorimetriert werden.

c) *Kolorimetrie und Berechnung.*

Die Vergleichslösung besteht aus 5.0 ccm *p*-Nitrophenol bekannter Konzentration und 5.0 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung. Beim Farbenvergleich wird auf das Okular des Kolorimeters eine dünne Glaskuvette gelegt, die nach Tanaka (1938) mit Berlinerblau gefüllt ist. Die Berechnung der %-Zahl der Hydrolyse ist sehr einfach und bedarf deshalb keiner Erklärung. Bei der obenerwähnten Versuchsbedingung ist die Endkonzentration des Substrats jedes Mal $M/2000$. Als Monoesteraseeinheit gilt eine solche Menge Phosphatase, die bei 37° in einer Stunde 40% ige Hydrolyse des *p*-Nitrophenolphosphats von $M/2000$ Endkonzentration bewirkt. Mit Erythrozytenmonoesterase soll, wie oben angegeben, die Hydrolyse unter Citrataktivierung bei Ph 6.0 ausgeführt werden und mit Plasmamonoesterase unter Magnesiumaktivierung bei Ph 9.0. Um aus dem gefundenen hydrolytischen Prozentsatz den Phosphatasegehalt der zum Versuch gebrauchten Menge der Erythrozytensuspension sowie des verdünnten Plasmas in Monoesteraseeinheiten auszurechnen, bedient man sich einer theoretischen monomolekularen Kurve, die nach Angabe von Ohmori auf dem Millimeterpapier als Ordinate das Hydrolyseprozent und als Abszisse die Zeit in Stunden graphisch so zeichnet, dass die Hydrolyse in einer Stunde 40% beträgt.

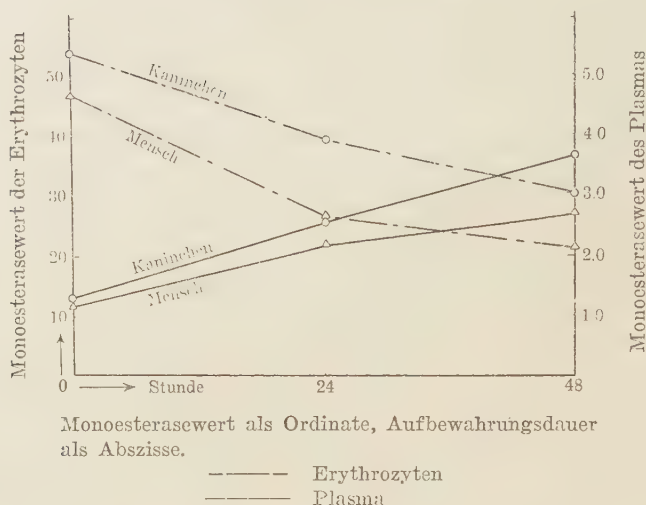
Falls die Versuchsdauer, wie bei den Erythrozyten, eine Stunde beträgt, wird aus jener Kurve die dem beobachteten Hydrolyseprozent entsprechende Zeit in Stunden abgelesen. Die Zahl gibt den Monoesterasegehalt in Einheiten an. 5.0 ccm Erythrozytensuspension entsprechen gemäss der Verdünnung 0.025 oder 0.0125 ccm Blut. Der abgelesene Monoesterasegehalt $\times 40$ resp. $\times 80$ ist daher der Erythrozytenmonoesterasewert des betreffenden Blutes, d. h. Monoesteraseeinheiten in 1 ccm Blut.

Die Wirkung der Plasmamonoesterase ist im allgemeinen weit schwächer als die des Erythrozytenferments. Daher wird — wie oben beschrieben — die Versuchsdauer von 1 auf 2–4 Stunden verlängert. Die Zunahme des freien *p*-Nitrophenols ist aber bei so schwacher Monoesterasewirkung der Versuchsdauer proportional, was ich auch beweisen konnte. Man kann dadurch, dass man den nach 2 oder 4 Stunden gemessenen hydrolytischen Prozentsatz durch 2 oder 4 dividiert, den einstündigen Prozentsatz und dann den Phosphatasegehalt des gebrauchten verdünnten Plasmas in Monoesteraseeinheiten ausrechnen. 3.0 ccm verdünnten Plasmas entsprechen 3/50 ccm Blut. Der gefundene Plasmamonoesterasegehalt $\times 50/3$ ist daher der Plasmamonoesterasewert. Das der verdünnten Citratlösung zugesetzte Blut muss möglichst schnell behandelt werden, andernfalls schwanken die Monoesterasewerte sowohl der Erythrozyten als auch des Plasmas.

Beim Kaninchenblut wird zum Beispiel, falls das 50 fach verdünnte Plasma und die 200 fach verdünnte Erythrozytensuspension im Eisschrank 24 oder 48 Stunden lang aufbewahrt worden sind, der Plasmamonoesterasewert höher; er beträgt 2.54 nach 24 Stunden und 3.67 nach 48 Stunden, während er sich gleich nach der Blutentnahme auf 1.24 beläuft. Der Erythrozytenmonoesterasewert wird andererseits niedriger; er beträgt 39.2 nach 24 Stunden, 30.3 nach 48 Stunden und gleich nach der Blutentnahme 54.0. Beim Menschenblut wird der Plasmamonoesterasewert mit zunehmender Zeit ebenfalls allmählich höher, der Erythrozytenmonoesterasewert dagegen immer niedriger. Aktivitätszunahme der aufbewahrten Sera hat auch Bodansky (1932) beobachtet.

Fig. 1.

Zeitliche Veränderungen des Plasma- und
Erythrozytenmonoesterasewerts.



Vorliegende Methodik hat den Vorzug, dass sie mit 0.1 ccm Blut eine genaue Phosphatasebestimmung in einfacher Weise und kurzer Zeit ausführen und den Gehalt sowohl der Plasma- als der Erythrozytenesterase in diesem Volumen Blut getrennt bestimmen lässt. Phosphatase des Plasmas oder Serums wurde bishér schon oft quantitativ ermittelt. Meine Monoestraseeinheit kann nicht ohne weiteres mit den Masseinheiten anderer Forscher verglichen werden, weil die Substrate sowie die Versuchsbedingungen verschieden sind. Ausserdem ergeben die meisten Bestimmungsmethoden, die bisher mitgeteilt worden sind, den Monoesterasegehalt in einem bestimmten Volumen des Plasmas oder Serums, während die vorliegende Methode den Plasmamonoesterasegehalt in einem bestimmten Blutvolumen angibt. Beide Angebeformen können für die klinische Untersuchung und das Tierexperiment gebraucht werden. Daher möchte ich nicht aus der Hämatokritzahl den Plasmamonoesterasewert in Monoesteraseeinheiten in 1 ccm Plasma umrechnen.

Die Blutmonoesterasewerte verschiedener Tiere wurden nach

meiner Methode ermittelt. Da der Monoesterasegehalt des Blutes nach dem Alter und auch bei Schwangeren verschieden sein soll, wurden ausgewachsene männliche Tiere verwandt. Wie in Protokollen angegeben ist, wurde die Bestimmung bei je einer Tierart an 5 Tieren durchgeführt. Die interindividuelle Schwankung ist nicht beträchtlich. Die durchschnittlichen Monoesterasewerte sind in Tabelle I zusammengestellt.

TABELLE I.

Durchschnittlicher Monoesterasewert des verschiedenen Tierblutes.

	Plasma	Erythrozyten
Meerschweinchen	0.76	23.07
Kaninchen	1.08	40.90
Mäuse	1.55	60.18
Ratten	2.13	79.47
Ziegen	3.24	8.06

Der Erythrozytenmonoesterasewert des Ziegenblutes ist auffallend niedrig, während der von Ratten- und Mäuseblut sehr hoch ist. Der Plasmamonoesterasewert des Ziegenblutes ergibt aber 3.24 und der des Rattenblutes 2.13. Wie unten angegeben, beträgt der von Männerblut (30. Lebensjahr) durchschnittlich 0.72. Crimm und Strayer (1936) haben nach der Bodansky'schen Methode das Rattenserum untersucht und einen fast 20 fach grösseren Phosphatasegehalt als im Menschenserum gefunden. Nach Bodansky (1933) enthalten 100 ccm Serum normaler Männer 1.5–4.0 Phosphatase seiner Einheiten und nach Untersuchungen amerikanischer Autoren das gleiche Volumen Ratten-serum 49.11 Bodansky-Einheiten. Wie diese hohen Zahl bekommen wurden, steht dahin. Kay (1930) hat bezüglich des Phosphatasegehalts des Plasmas folgende Angabe gemacht: das Menschenplasma soll 0.15 und das Rattenplasma 0.40 Kay-Einheiten enthalten.

Die Veränderung der Monoesterasewerte nach dem Lebensalter wurde bei gesunden Menschen untersucht. Bei Mädchen und

Frauen wurde die Menstruationszeit vermieden. Die durchschnittlichen Werte sind in Tabelle II zusammengestellt.

TABELLE II.
Durchschnittlicher Monoesterasewert des Menschenblutes. *

Lebensjahre	Geschlecht	Plasma	Erythrozyten
11-13	Knaben	3.65	19.22
11-13	Mädchen	3.52	20.44
16-17	Mädchen	1.91	33.90
16-19	Jünglinge	0.84	18.55
18-23	Mädchen	0.85	30.14
27-34	Männer	0.72	18.33
41-50	Frauen	0.88	32.65
71-83	Männer	1.30	20.88
72-82	Frauen	1.38	24.00

Der Plasmamonoesterasewert beträgt bei Schulkindern 3.5-3.6. Er verringert sich mit 16-17 Lebensjahren, um später fast konstant zu bleiben. Von dem Geschlecht ist er fast unabhängig. Nur bei Mädchen scheint die Abnahme der Plasmamonoesterase später als bei Jünglingen einzutreten. Im Greisenalter ist bei beiden Geschlechtern ein leichter Anstieg vorhanden. Der Erythrozytenmonoesterasewert ist bei dem männlichen Geschlecht das ganze Leben hindurch unverändert. Beim weiblichen wird zwischen 16-45 Lebensjahren ein höherer Wert gemessen. In der Kinderzeit und im Greisenalter ist der Plasmawert aber fast gleich dem männlichen.

Kay (1930) hat mitgeteilt, dass der Phosphatasewert im Plasma der jungen Tiere höher als in dem der erwachsenen ist. Damit übereinstimmende Angaben wurden auch von Smith und Maizels (1932), Stearns und Warweg (1933) und anderen gemacht. Die mit der *p*-Nitrophenolmethode durchgeführte Bestimmung ergab im grossen und ganzen den früheren Angaben gleiche Werte.

Ich habe dann bei Kaninchen mit meiner Methode untersucht, wie der Blutphosphatasespiegel durch Adrenalin, Insulin,

Ascorbinsäure, Thyroxin und Vitamin D beeinflusst wird. Eine Stunde nach intravenöser Injektion von 0.3 ccm Adrenalinchlorid (1 : 1000) pro kg war aber der Monoesterasewert sowohl der Erythrozyten als des Plasmas unverändert. Intravenöse Injektion von 1.5 oder 3.0 Einheiten Insulin pro kg rief auch nach 1 Stunde keine Veränderung des Erythrozyten- und Plasmamonoesterasewerts hervor. Eine Stunde nach intravenöser Injektion von 0.3 mg Thyroxin (Roche) pro kg war der Monoesterasewert der Erythrozyten und des Plasmas unverändert. Subcutane Injektion von 0.3 mg Thyroxin pro kg täglich wurde 7 Tage fortgesetzt, aber währenddessen und auch nach einer Woche war keine Veränderung des Erythrozyten- und Plasmamonoesterasewerts festzustellen. Auch intravenöse Injektion von 30 mg *l*-Ascorbinsäure pro kg hatte 1 Stunde nach der Injektion den Monoesterasewert des Blutes nicht verändert.

Als Vitamin D wurde Vigantol (Bayer) gebraucht. Ungefähr 3000 internationale Einheiten pro kg wurden täglich 7 Tage per os verabreicht. Direkt vor dem Versuch, am 4ten, 7ten Tage und 14ten Tage, also 1 Woche nach der letzten Vitaminverabreichung, wurde das Blut bezüglich Phosphatasegehalt untersucht. Die Kaninchen zeigten vom 4ten Tage an Neigung zur Diarrhoe, eine Körpergewichtabnahme wurde aber nicht beobachtet. Der Erythrozytenmonoesterasewert fiel ziemlich stark am 4ten Tag ab, kehrte aber schon am 7ten Tage zum Vorversuchswert zurück. Der Plasmamonoesterasewert war am 4ten Tage fast unverändert, verminderte sich aber über 50% am 7ten Tage.

ERGEBNISSE.

Bei einigen Erythrozytenversuchen wurden 5.0 ccm 400 fach verdünnter Suspension gebraucht, die durch Aufschwemmen der abgeschleuderten Erythrozyten aus 0.1 ccm Blut in 40 ccm verdünnten Citratpuffers hergestellt wurde. In den nachstehenden Protokollen sind diese Versuche mit * gekennzeichnet. Die Hydrolysedauer beträgt dabei 1 Stunde. Wie durch Ohmori untersucht, ist der Monoesterasewert von der Verdünnung des Blutes unabhängig. Die Plasmaversuche dauerten 4 oder 2 Stunden.

Die gefundene *p*-Nitrophenolmenge und das Hydrolyse-% wurden für 1 Stunde umgerechnet. Die berechneten Zahlen sind in den Protokollen angegeben.

A. Tierversuche.

TABELLE III.

1. Phosphomonoesterasewert des Meerschweichens (♂).

Für die Versuche wurden Tiere von ungefähr 750 g Körpergewicht verwendet. Die Blutentnahme erfolgte durch Herzpunktion.

Tiere-Nr.	Plasma			Erythrozyten		
	<i>p</i> -Nitrophenol mg	%	Monoesterasewert	<i>p</i> -Nitrophenol mg	%	Monoesterasewert
1	0.0081	2.32	0.74	0.0420	24.2	21.76
2	0.0087	2.50	0.79	0.0410	23.6	21.08
3	0.0071	2.04	0.64	0.0448	25.8	23.40
4	0.0108	3.11	0.99	0.0463	26.6	24.30
5	0.0071	2.04	0.64	0.0470	27.0	24.80

TABELLE IV.

2. Ziegen (♂).

Tiere-Nr.	Plasma			Erythrozyten		
	<i>p</i> -Nitrophenol mg	%	Monoesterasewert	<i>p</i> -Nitrophenol mg	%	Monoesterasewert
1	0.0414	11.91	4.18	0.0171	9.8	8.20
2	0.0437	12.57	4.34	0.0181	10.4	8.72
3	0.0304	8.75	2.92	0.0161	9.3	7.60
4	0.0239	6.90	2.34	0.0161	9.3	7.60
5	0.0250	7.20	2.42	0.0171	9.8	8.20

TABELLE V.

3. Kaninchen (♂) von 2.6–2.7 kg Körpergewicht.

Tiere-Nr.	Plasma			Erythrozyten		
	<i>p</i> -Nitrophenol mg	%	Monoesterasewert	<i>p</i> -Nitrophenol mg	%	Monoesterasewert
1	0.0114	3.28	1.05	0.0654	37.6	37.04
2	0.0100	2.88	0.92	0.0697	40.0	40.00
3	0.0116	3.34	1.07	0.0804	46.2	48.40
4	0.0126	3.63	1.12	0.0654	37.6	37.04
5	0.0136	3.91	1.24	0.0720	41.4	42.00

TABELLE VI.

4. Ratten (♂) von ungefähr 200 g Körpergewicht.
Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des blossgelegten Herzens.

Tiere- Nr.	Plasma			Erythrozyten		
	<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono- esterasewert	<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono- esterasewert
1	0.0176	5.07	1.60	* 0.0588	* 33.8	64.80
2	0.0180	5.17	1.65	* 0.0566	* 32.6	61.92
3	0.0290	8.35	2.87	* 0.0763	* 43.8	90.40
4	0.0210	6.05	2.00	* 0.0782	* 45.0	93.04
5	0.0260	7.47	2.51	* 0.0743	* 42.7	87.20

TABELLE VII.

5. Mäuse (♂) von ungefähr 12 g Körpergewicht.
Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des blossgelegten Herzens.

Tiere- Nr.	Plasma			Erythrozyten		
	<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono- esterasewert	<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono- esterasewert
1	0.0174	5.01	1.59	0.0956	55.0	62.00
2	0.0138	3.98	1.25	0.0945	54.5	61.60
3	0.0200	5.75	1.84	0.0790	45.5	47.60
4	0.0125	3.60	1.12	0.0870	50.0	54.00
5	0.0187	5.37	1.74	0.0970	55.7	63.48
6	0.0190	5.46	1.76	0.1050	60.4	72.40

B. Menschen.

TABELLE VIII.

1. Monoesterasewert des Blutes von 11-13 jährigen Knaben.

Name	Lebens- jahre	Plasma			Erythrozyten		
		<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono- esterase- wert	<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono- esterase- wert
N.K.	11	0.0360	10.35	3.51	* 0.0264	* 15.2	25.60
Y.O.	11	0.0279	8.03	2.67	* 0.0232	* 13.3	22.40
H.S.	12	0.0287	8.26	2.81	* 0.0204	* 11.7	19.60
N.H.	13	0.0380	10.93	3.96	* 0.0196	* 11.3	18.80
S.A.	11	0.0327	9.41	3.17	* 0.0218	* 12.5	20.96
N.T.	13	0.0312	9.00	3.01	* 0.0194	* 11.2	18.16
Y.A.	12	0.0502	14.44	5.09	* 0.0170	* 9.8	16.40
M.S.	11	0.0442	12.72	4.43	* 0.0180	* 10.3	17.20
S.K.	11	0.0357	10.30	3.51	* 0.0191	* 11.0	18.16
M.K.	11	0.0432	12.43	4.31	* 0.0158	* 9.1	14.88

TABELLE IX.

2. Mädchen von 11-13 Jahren.

Name	Lebens-jahre	Plasma			Erythrozyten		
		<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono-esterase-wert	<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono-esterase-wert
C.K.	12	0.0204	5.87	1.95	* 0.0245	* 14.1	23.84
N.H.	11	0.0627	18.04	6.46	* 0.0185	* 10.6	17.60
R.O.	13	0.0456	13.12	4.51	* 0.0190	* 10.9	18.00
K.H.	11	0.0204	5.87	1.95	* 0.0204	* 11.7	19.60
H.K.	11	0.0392	11.28	3.97	* 0.0191	* 11.0	18.16
T.O.	12	0.0254	7.31	2.46	* 0.0199	* 11.4	19.20
M.K.	11	0.0232	6.70	2.22	* 0.0235	* 13.5	22.40
I.O.	11	0.0352	10.13	3.44	* 0.0215	* 12.4	20.80
K.Y.	12	0.0442	12.72	4.43	* 0.0248	* 14.3	24.40

TABELLE X.

3. Mädchen (Pflegerinnen) von 16-17 Jahren.

Name	Lebens-jahre	Plasma			Erythrozyten		
		<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono-esterase-wert	<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono-esterase-wert
E.Y.	16	0.0117	3.37	1.07	* 0.0374	* 21.5	37.36
N.Y.	16	0.0263	7.57	2.56	* 0.0391	* 22.4	40.00
T.Y.	16	0.0283	8.15	2.77	* 0.0305	* 17.6	30.40
M.O.	17	0.0216	6.20	2.05	* 0.0302	* 17.5	29.72
M.T.	17	0.0125	3.60	1.12	* 0.0325	* 18.7	32.00

TABELLE XI.

4. Mädchen (Pflegerinnen) von 18-23 Jahren.

Name	Lebens-jahre	Plasma			Erythrozyten		
		<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono-esterase-wert	<i>p</i> -Nitro-phenol mg	%	Mono-esterase-wert
S.S.	18	0.0095	2.73	0.85	0.0574	33.0	31.40
S.S.	20	0.0098	2.82	0.89	* 0.0387	* 22.2	39.20
Y.S.	20	0.0090	2.58	0.80	0.0407	23.4	21.08
M.I.	23	0.0096	2.76	0.87	0.0435	25.0	22.60
K.I.	22	0.0093	2.67	0.84	* 0.0350	* 20.3	36.40

TABELLE XII.

5. Jünglinge (Ladenburschen) von 16-19 Jahren.

Name	Lebens- jahre	Plasma			Erythrozyten		
		p-Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert	p-Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert
A.H.	16	0.0111	3.19	1.00	* 0.0199	* 11.5	19.20
Y.I.	17	0.0103	2.96	0.95	* 0.0195	* 11.2	18.80
T.Y.	18	0.0091	2.62	0.82	* 0.0193	* 11.1	18.24
Y.O.	18	0.0087	2.50	0.78	* 0.0188	* 10.8	17.84
O.H.	19	0.0082	2.36	0.75	* 0.0196	* 11.3	18.96
Y.O.	19	0.0077	2.21	0.70	* 0.0192	* 11.1	18.24

TABELLE XIII.

6. Erwachsene Männer (Ärzte) von 27-34 Jahren.

Name	Lebens- jahre	Plasma			Erythrozyten		
		p-Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert	p-Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert
H.I.	34	0.0078	2.24	0.71	0.0355	20.1	17.60
S.E.	27	0.0081	2.33	0.74	0.0311	17.9	15.40
H.F.	30	0.0072	2.07	0.65	0.0340	19.6	16.96
T.I.	33	0.0083	2.38	0.77	0.0423	24.3	22.00
R.S.	28	0.0086	2.47	0.79	0.0397	22.8	20.40
M.T.	31	0.0075	2.16	0.67	0.0386	22.2	19.60

TABELLE XIV.

7. Frauen von 41-50 Jahren.

Name	Lebens- jahre	Plasma			Erythrozyten		
		p-Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert	p-Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert
H.O.	44	0.0096	2.76	0.87	* 0.0235	* 13.5	22.40
K.A.	45	0.0077	2.21	0.70	* 0.0290	* 16.7	28.40
H.I.	43	0.0085	2.44	0.77	* 0.0353	* 20.3	35.76
A.N.	41	0.0075	2.16	0.67	* 0.0348	* 20.0	34.80
I.A.	47	0.0120	3.45	1.09	* 0.0410	* 23.5	42.24
Y.A.	50	0.0131	3.77	1.15	* 0.0325	* 18.7	32.32

TABELLE XV.

8. Alte Männer von 71-83 Jahren.

Name	Lebens- jahre	Plasma			Erythrozyten		
		<i>p</i> -Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert	<i>p</i> -Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert
M.O.	73	0.0132	3.80	1.24	* 0.0222	* 12.7	21.20
K.S.	71	0.0162	4.66	1.47	* 0.0224	* 12.9	21.60
S.Y.	78	0.0158	4.55	1.45	* 0.0223	* 12.9	21.60
M.M.	71	0.0146	4.20	1.29	* 0.0218	* 12.5	20.80
J.O.	83	0.0114	3.28	1.05	* 0.0202	* 11.6	19.20

TABELLE XVI.

9. Alte Frauen von 72-82 Jahren.

Name	Lebens- jahre	Plasma			Erythrozyten		
		<i>p</i> -Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert	<i>p</i> -Nitro- phenol mg	%	Mono- esterase- wert
E.T.	75	0.0148	4.25	1.29	* 0.0254	* 14.6	24.80
M.K.	72	0.0174	5.01	1.59	* 0.0217	* 12.5	20.80
T.K.	82	0.0140	4.03	1.25	* 0.0270	* 15.5	26.40

C. *Der Einfluss von Adrenalin, Insulin, Ascorbinsäure, Thyroxin und Vitamin D auf den Kaninchenmonoesterasewert.*

TABELLE XVII.

1. Der Einfluss von Adrenalinchlorid auf den Monoesterasewert.
Intravenöse Injektion von 0.3 ccm Adrenalinchlorid (1:1000)
pro kg Körpergewicht.

		Nr. 1		Nr. 2	
		Vorversuch	nach 1 Stunde	Vorversuch	nach 1 Stunde
Plasma	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0102	0.0092	0.0082	0.0070
	%	2.93	2.65	2.36	2.02
	Monoesterase- wert	0.94	0.84	0.75	0.64
Erythro- zyten	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0760	0.0800	0.0707	0.0710
	%	43.7	46.0	40.7	40.9
	Monoesterase- wert	44.88	48.00	40.92	41.04

		Nr. 3		Nr. 4	
		Vorversuch	nach 1 Stunde	Vorversuch	nach 1 Stunde
Plasma	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0085	0.0095	0.0090	0.0127
	%	2.45	2.73	2.59	3.65
	Monoesterase- wert	0.79	0.85	0.80	1.14
Erythro- zyten	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0610	0.0620	0.0680	0.0690
	%	35.1	35.7	39.1	39.7
	Monoesterase- wert	33.76	34.52	38.80	39.60

TABELLE XVIII.

2. Der Einfluss von Insulin auf den Monoesterasewert.

(a) Intravenöse Injektion von 1.5 Einheiten

Insulin pro kg Körpergewicht.

		Nr. 1		Nr. 2	
		Vorversuch	nach 1 Stunde	Vorversuch	nach 1 Stunde
Plasma	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0078	0.0080	0.0055	0.0057
	%	2.24	2.29	1.52	1.64
	Monoesterase- wert	0.71	0.75	0.49	0.52
Erythro- zyten	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0570	0.0560	0.0405	0.0396
	%	32.8	32.2	23.3	22.8
	Monoesterase- wert	31.20	30.60	20.80	20.40

		Nr. 3		Nr. 4	
		Vorversuch	nach 1 Stunde	Vorversuch	nach 1 Stunde
Plasma	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0080	0.0080	0.0081	0.0080
	%	2.29	2.29	2.30	2.29
	Monoesterase- wert	0.75	0.75	0.76	0.75
Erythro- zyten	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0549	0.0549	0.0564	0.0567
	%	31.4	31.4	32.5	32.6
	Monoesterase- wert	29.60	29.60	30.80	30.92

TABELLE XIX.

(b) Intravenöse Injektion von 3.0 Einheiten
Insulin pro kg Körpergewicht.

		Nr. 1		Nr. 2	
		Vorversuch	nach 1 Stunde	Vorversuch	nach 1 Stunde
Plasma	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0045	0.0066	0.0056	0.0063
	%	1.30	1.89	1.61	1.81
	Monoesterase- wert	0.42	0.62	0.50	0.59
Erythro- zyten	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0610	0.0620	0.0600	0.0600
	%	35.1	35.7	34.5	34.5
	Monoesterase- wert	33.70	34.52	33.20	33.20

		Nr. 3		Nr. 4	
		Vorversuch	nach 1 Stunde	Vorversuch	nach 1 Stunde
Plasma	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0091	0.0091	0.0093	0.0094
	%	2.63	2.63	2.69	2.71
	Monoesterase- wert	0.82	0.82	0.85	0.87
Erythro- zyten	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0522	0.0517	0.0549	0.0549
	%	30.0	29.7	31.4	31.4
	Monoesterase- wert	28.00	27.60	29.60	29.60

TABELLE XX.

3. Der Einfluss von *l*-Ascorbinsäure auf den Monoesterasewert.
Intravenöse Injektion von 30 mg *l*-Ascorbinsäure
pro kg Körpergewicht.

		Nr. 1		Nr. 2	
		Vorversuch	nach 1 Stunde	Vorversuch	nach 1 Stunde
Plasma	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0088	0.0083	0.0063	0.0054
	%	2.53	2.39	1.81	1.55
	Monoesterase- wert	0.79	0.77	0.59	0.50
Erythro- zyten	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0750	0.0760	0.0720	0.0770
	%	43.2	43.7	41.4	44.3
	Monoesterase- wert	44.20	44.80	42.00	45.60

TABELLE XXI.

4. Der Einfluss von Thyroxin auf den Monoesterasewert.

(a) Intravenöse Injektion von 0.1 mg Thyroxin
pro kg Körpergewicht.

		Nr. 1		Nr. 2	
		Vorversuch	nach 1 Stunde	Vorversuch	nach 1 Stunde
Plasma	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0067	0.0047	0.0057	0.0056
	%	1.93	1.35	1.64	1.61
	Monoesterase- wert	0.62	0.45	0.52	0.50
Erythro- zyten	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0725	0.0780	0.0625	0.0600
	%	41.7	44.9	36.0	34.5
	Monoesterase- wert	42.20	46.40	35.00	33.20

TABELLE XXII.

(b) Intravenöse Injektion von 0.3 mg Thyroxin
pro kg Körpergewicht.

		Nr. 3		Nr. 4	
		Vorversuch	nach 1 Stunde	Vorversuch	nach 1 Stunde
Plasma	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0060	0.0062	0.0067	0.0078
	%	1.73	1.80	1.93	2.24
	Monoesterase- wert	0.53	0.59	0.62	0.71
Erythro- zyten	<i>p</i> -Nitrophenol	0.0770	0.0775	0.0757	0.0714
	%	44.3	44.5	43.6	41.1
	Monoesterase- wert	45.60	46.00	44.80	41.60

TABELLE XXIII.

(c) Subkutane Injektion von 0.3 mg Thyroxin pro kg
Körpergewicht täglich 7 Tage.

	Körper- gewicht	Nr. 5			
		Plasma		Erythrozyten	
		%	Monoesterasewert	%	Monoesterasewert
Vorversuch	1.85	2.86	0.92	28.7	26.40
4. Tage	1.91	2.61	0.80	28.8	26.68
7. "	1.93	2.50	0.79	28.1	26.00
14. "	2.17	2.77	0.90	28.1	26.00

TABELLE XXIV.

5. Der Einfluss der D-Vitaminverabreichung auf den Monoesterasewert.

0.7 cem Vigantol wurde 7 Tage täglich verabreicht.

1 cem enthält 12000 internationale Einheiten.

	Körper- gewicht	Nr. 1			
		Plasma		Erythrozyten	
		%	Monoesterasewert	%	Monoesterasewert
Vorversuch	2.68	3.97	1.25	40.6	40.80
4. Tage	2.83	4.34	1.37	30.2	28.16
7. "	2.78	1.44	0.45	38.5	38.20
14. "	2.88	1.40	0.48	46.8	49.20

	Körper- gewicht	Nr. 2			
		Plasma		Erythrozyten	
		%	Monoesterasewert	%	Monoesterasewert
Vorversuch	2.63	4.43	1.39	39.7	39.60
4. Tage	2.77	3.86	1.23	29.1	27.00
7. "	2.64	1.32	0.42	39.4	39.20
14. "	2.78	3.65	1.13	41.4	41.84

	Körper- gewicht	Nr. 3			
		Plasma		Erythrozyten	
		%	Monoesterasewert	%	Monoesterasewert
Vorversuch	2.45	2.25	0.73	31.1	29.20
4. Tage	2.39	1.98	0.63	24.3	21.84
7. "	2.42	1.84	0.58	26.1	23.72
14. "	2.47	2.28	0.73	32.5	30.80

	Körper- gewicht	Nr. 4			
		Plasma		Erythrozyten	
		%	Monoesterasewert	%	Monoesterasewert
Vorversuch	2.36	3.33	1.04	30.2	28.16
4. Tage	2.26	3.63	1.14	21.9	19.40
7. "	2.13	1.38	0.45	27.8	25.60
8. "	gestorben				

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Unter Verwendung von *p*-Nitrophenolphosphat wurde eine Mikromethode der Phosphomonoesterasebestimmung ausgearbeitet, die mit 0.1 ccm Blut das Ferment sowohl der Erythrozyten als des Plasmas messen lässt.

2. Die Methodik bezieht sich auf die kolorimetrische Bestimmung des abgespaltenen freien *p*-Nitrophenols, daher ist irgendein Kontrollversuch unnötig.

3. Die Hydrolysedauer beträgt bei Erythrozytensuspension 1 Stunde und bei verdünntem Plasma 2–4 Stunden.

4. Eine neue Monoesterase-Einheit wird vorgeschlagen, die sich bei der vorliegenden Messmethode gut bewährt hat.

5. Erythrozyten- und Plasmamonoesterasewerte wurden im Blut von Ratten, Mäusen, Kaninchen, Meerschweinchen und Ziegen gemessen.

6. Die Schwankung der Blutmonoesterasewerte der Menschen nach Lebensalter und Geschlecht wurde bestimmt.

7. Der Monoesterasegehalt der Erythrozyten und des Plasmas in einem bestimmten Volumen Blut wird durch Adrenalin, Insulin, Ascorbinsäure und Thyroxininjektion nicht verändert, nach Verabreichung von Vitamin D aber stark herabgesetzt.

LITERATUR.

- Bodansky, A. (1932): Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **29**, 1292.
Bodansky, A. (1933): J. Biol. Chem., **101**, 93.
Crimm, P. D. u. Strayer, J. W. (1936): J. Biol. Chem., **112**, 511.
Kay, H. D. (1930): J. Biol. Chem., **89**, 235.
Morimoto, K. (1937): J. Biochem., **26**, 259.
Ohmori, Y. (1937): Enzymologia, **4**, 217.
Smith, J. u. Maizels, M. (1932): Arch. Dis. Child., **7**, 149.
Stearns, G. u. Warweg, E. (1933): J. Biol. Chem., **102**, 749.
Tanaka, S. (1938): J. Biochem., **28**, 119.



STUDIEN ÜBER CARBOHYDRASE.

I. Die fermentative Hydrolyse der *p*-Nitrophenol-glukoside.

Von

KATSUSE AIZAWA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba, Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 4. Februar 1939)

p-Nitrophenolverbindungen wurden zu Fermentstudien zuerst von Morimoto (1937) im hiesigen Institut verwandt. Morimoto hat bei der Sulfataseforschung das enzymatisch aus dem *p*-Nitrophenolsulfat frei gewordene *p*-Nitrophenol kolorimetrisch bestimmt. Ohmori (1937) hat den Phosphorsäureester des *p*-Nitrophenols zum Phosphataseversuch mit gutem Erfolg gebraucht. Diese Methodik wurde weiter von Fujita (1939) zur Mikrobe-stimmungsmethode der Blutphosphatase ausgearbeitet, die mit 0.1 cem Blut ausführbar ist und dabei den Phosphatasegehalt der Erythrozyten und des Plasmas gesondert zu ergeben instande ist.

Der Vorzug dieser *p*-Nitrophenolmethode wurde schon von Fujita ausführlich erwähnt. Man misst in alkalischer Lösung das freie *p*-Nitrophenol einfach auf kolorimetrischem Weg und berechnet daraus das hydrolytische Prozent. Bei dem Phosphataseversuch wird also die Bestimmung des Ferments durch die Anwesenheit des anorganischen oder organisch gebundenen Phosphats in der zu untersuchenden Fermentlösung oder Organsuspension nicht gestört. Da ausserdem eine sehr kleine Menge *p*-Nitrophenol auch gut bestimmbar ist, kann man mit einer stark verdünnten Substratlösung die Fermentversuche ausführen. Dies ist bei den Sulfatasestudien sehr zweckmässig, weil der Gehalt dieses Ferments in der Leber sehr gering ist.

Enzymatische Hexosidspaltung wurde bisher meistens polari-

metrisch oder reduktometrisch untersucht. Um den Hydrolysegrad nach der bemessenen Drehungsdifferenz quantitativ zu ermitteln, muss die Konzentration der Glukoside mässig stark sein. Mit einer Fermentlösung von schwacher Aktivität kann es aber häufig vorkommen, dass die Veränderung der Rotation zu gering ist, um den Hydrolysegrad zahlenmässig genau anzugeben. Die zweite Methode, d. h. das Verfolgen der Zunahme des Reduktionsvermögens, bedarf eines Kontrollversuchs mit der Organsuspension oder Fermentlösung allein, um damit die gefundene Reduktion durch Abzug zu korrigieren. Auch bei dieser Methode muss das Substrat mässig konzentriert sein und ausserdem soll die auf Kontrolle beruhende Korrektion in möglichst kleinem Umfang bleiben, was aber beim Versuch mit natürlichem noch nicht gereinigtem Fermentmaterial von schwacher Aktivität häufig nicht möglich ist. Die *p*-Nitrophenolmethode verspricht also eine einfache Ausführung der Glukosidasebestimmung. Ich habe daher unter Leitung von Prof. Akamatsu die Glukoside des *p*-Nitrophenols dargestellt und damit Fermentversuche ausgeführt.

p-Nitrophenol- β -glukosid wurde schon von Glaser und Wulwek (1924) synthetisiert. Ich konnte ihre Angaben bestätigen. Das so hergestellte β -Glukosid krystallisierte in Nadeln, enthielt ein Molekül Krystallwasser und schmolz bei 164° . $[\alpha]_D^{20} = -98.7^{\circ}$. Nach Glaser und Wulwek ist F $164-165^{\circ}$ und $[\alpha]_D^{20} = -99^{\circ}$.

Einfache und schöne Synthesen der verschiedenen Hexoside verdanken wir in neuer Zeit den zahlreichen Arbeiten aus dem Leipziger Institut von Herrn Prof. Helferich. Er hat Pentaacetylglukose mit der zu verknüpfenden Oxyverbindung erhitzt, wobei als Katalysator für die α -Glukosidsynthese Zinkchlorid und für die β -Glukosidbildung *p*-Toluolsulfonsäure zugesetzt wurde. Manche Verbindungen von Hexosidnatur konnten so hergestellt werden. Helferich und Peters (1933) haben aber angegeben, dass sie *p*-Nitrophenol- β -glukosid gewonnen hätten, indem Pentaacetylglukose unter Zusatz von Zinkchlorid zusammen mit *p*-Nitrophenol eingeschmolzen und das daraus isolierte Tetraacetat verseift wurde. Nach Trocknung bei 100° bis zur Gewichtkonstante zeigte

das so erhaltene *p*-Nitrophenol- β -glukosid nach ihrer Angabe F 150–152° und spezifische Drehung von -103° . Falls dieser $[\alpha]$ -Wert für die krystallwasserhaltige Substanz umgerechnet wird, beträgt er -97.2° und stimmt gut mit unserer Zahl überein. Nach dem Prinzip der Helferichschen Synthese des β -Glukosids musste man aber als Katalysator *p*-Toluol-sulfonsäure statt Zinkchlorid gebrauchen.

Ich habe nun die Synthese des *p*-Nitrophenol- α -glukosids unter Verwendung von Zinkchlorid als Katalysator nach Helferichem Prinzip durchgeführt. Das erhaltene Glukosid bildete nadlige Krystalle ohne Krystallwasser, schmolz bei 210° und zeigte $[\alpha]_D^{20} = +215^\circ$. Wie im experimentellen Teil angegeben, habe ich die theoretische spezifische Drehung des α -Glukosids nach der Hudsonschen Regel berechnet. $[\alpha]_D^{20} = +213.4^\circ$. Sie stimmte mit der beobachteten Zahl ganz gut überein.

Zuerst habe ich die Wirkung des Emulsins untersucht. Wie oben erwähnt, war die Endkonzentration des Substrats M/2000, das hydrolytische Prozent wurde aus der kolorimetrisch bestimmten freien *p*-Nitrophenolmenge berechnet. *p*-Nitrophenol- β -glukosid war durch Emulsin leicht hydrolysierbar. Das PH-Optimum lag bei PH 6 (Versuch Ia). Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Willstätter und anderen (1921) berichteten Wert überein. Die Emulsinlösung wurde dann bei 37° 2 Tage lang aufbewahrt. Das PH-Optimum blieb unverändert. Diese Lösung konnte weiter gegen destilliertes Wasser dialysiert werden, ohne die Lage des Optimums zu verändern (Versuch Ib u. Ic). *p*-Nitrophenol- α -glukosid wurde dagegen durch Emulsin gar nicht hydrolysiert, was bewies, dass das vorliegende α -Glukosid durchweg kein β -Glukosid enthielt.

Takadiastase spaltete sowohl α - und β -Glukosid, in beiden Fällen lag das PH-Optimum bei PH 5 (Versuch IIa und IIb). Dass die Takadiastase, die Maltase enthält, auch α -Heteroglukosid hydrolysiert, war bisher unbekannt. Bei meinem Versuch war die α -Glukosidspaltung nicht stark genug. Der Fermentgehalt der Takadiastase schwankt nämlich je nach dem Präparat. Wir haben kürzlich eine noch weit grössere Wirksamkeit bei einem

Präparat beobachtet, wovon bei anderer Gelegenheit berichtet wird. Über die Anwesenheit von β -Heteroglukosidase in der Takadiastase hat andererseits Hatano (1924) aus dem Neubergschen Institut zum erstenmal Angaben gemacht. Unabhängig davon bestätigte das Matsumoto (1928). Nach Hattori (1924) sollte Takadiastase dagegen auf das β -Glukosid unwirksam sein. Unter Anwendung der *p*-Nitrophenolmethode konnte die Hydrolysierbarkeit des β -Glukosids durch Takaferment aber leicht und klar bewiesen werden.

Danach wurden Versuche mit tierischer Glukosidase angestellt. Leber, Nieren, Milz, Lunge, Hoden und Muskel des Kaninchens wurden zermahlen, in 10 fachem Volumen Wasser suspendiert und diese Aufschwemmungen als Fermentlösungen gebraucht. Versuche bei PH 7 ergaben, dass das *p*-Nitrophenol- α -glukosid durch jede der erwähnten Organsuspensionen gespalten werden konnte (Versuch III). Die Hydrolysierbarkeit des α -Heteroglukosids durch tierische Organe wurde damit zum erstenmal beobachtet. Nach der Fermentlehre glaubte man, dass sowohl tierische Maltase als auch Takamaltase α -Heteroglukosid nicht zu spalten imstande sind, man hat daher diese Fermentklasse als die Glukomaltase beschrieben. Diese Verhältnisse müssen in Zukunft noch eingehend untersucht werden. Die PH-Optimumbestimmung wurde ebenfalls mit der Lebersuspension ausgeführt. Das Optimum lag bei PH 7 (Versuch IVa).

Auch die Hydrolyse des β -Heteroglukosids durch tierische Organe war bisher nicht ganz klar. Es gibt Angaben, die für wirkliche Spaltung sprechen, sie gingen aber nicht weit über qualitative Befunde hinaus. Man benutzte z. B. Arbutin als Substrat und bewies das daraus entstandene Hydrochinon durch Reduzierbarkeit der zugesetzten ammoniakalischen Silberlösung bei Kälte, oder man verwandte als Substrat Salicin und bewies den abgespaltenen Salicylalkohol durch blaue Eisenreaktion. Bass (1912) hat die Arbutinspaltung quantitativ untersucht. Er hat das durch Reduktion der ammoniakalischen Silberlösung entstandene Silber gesammelt, in Salpetersäure gelöst und mittels Rhodanlösung titrimetrisch bestimmt. Ob diese Methodik

einwandfrei ist, steht dahin. Hofmann (1935) hat die Hydrolysierbarkeit des Phenol- β -glukosids durch Leber und Niere von Kaninchen und Pferd angegeben. Zur Messung des Hydrolysegrads bestimmte er aber im einfachen Filtrat die Reduktionskraft gegenüber Fehlingscher oder Ostscher Lösung. Kontrolle mit Ferment allein wurde selbstverständlich parallel ausgeführt. Da jedoch bei dieser Lehmann-Maquenne'schen Methode die abzuziehenden Kontrollwerte bisweilen beträchtlich gross sein können, wird bei quantitativer Glukosidasmessung ein gering prozentiger Fehler der Zuckerbestimmung unter Umständen falsche Ergebnisse bedingen.

Ich liess die oben erwähnten Organsuspensionen auf *p*-Nitrophenol- β -glukosid bei 37° 2 Stunden einwirken. Eine deutliche Hydrolyse wurde bei Leber und Niere, aber nicht bei Milz, Lunge, Hoden und Muskel (Versuch III) beobachtet. Beim Versuch mittels Lebersuspension wurde das P_{II}-Optimum bei P_{II} 6 gefunden (Versuch IVb). Weiterhin wurde diese Suspension unter Toluolzusatz 2 Tage bei 37° autolysiert und das klare Filtrat dann als Fermentlösung gebraucht. Das Optimum lag bei P_{II} 6. Das Autolysat konnte dialysiert werden, ohne dass eine Verschiebung des optimalen P_{II} oder eine wesentliche Inaktivierung des Ferments experimentell nachgewiesen wurde.

Ein wichtiger Befund war, dass das auf oben erwähnte Weise hergestellte Autolysat der Kaninchenleber das *p*-Nitrophenol- α -glukosid nicht mehr spalten konnte. α -Glukosidase ist also weit mehr labil als die β -Glukosidase. Wegen dieser Unbeständigkeit des Ferments und der allgemeinen Schwierigkeit der α -Glukosidbereitung wurde die α -Heteroglukosidase bisher nur unzureichend erforscht.

Die Anwendung der *p*-Nitrophenolverbindung wird auf dem Gebiet der Fermentforschung noch neue Befunde zeitigen. Über die β -Galaktosidase soll später berichtet werden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

I. Substrate.

a) *p*-Nitrophenol- β -glukosid wurde zuerst nach Glaser und Wulwek (1924) dargestellt und aus heissem Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt 164°. Krystallwasser 1 Molekül. Freies *p*-Nitrophenol wurde nicht bewiesen. Die Bestimmung des gebundenen *p*-Nitrophenols geschah, wie folgt. 4.29 mg krystallwasserhaltige Substanz wurde in 100 cem Wasser gelöst, 2.0 cem davon durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert, in 10.0 cem Messzylinder mit gesättigtem Natriumcarbonat alkaliisiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Die gelbe Verfärbung wurde mit der alkalischen *p*-Nitrophenollösung von bekanntem Gehalt kolorimetrisch verglichen. Über die Kolorimetrie des *p*-Nitrophenols siehe die Mitteilung von Morimoto (1937) und Tanaka (1938). Gefundenes *p*-Nitrophenol aus 4.29 mg Substanz war 1.90 mg; berechneter Wert 1.90 mg. Zur Bestimmung der spezifischen Drehung wurden 0.2482 g in 25 cem Messkolben mit Wasser gelöst.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0.98 \times 25}{0.2482} = -98.7^\circ$$

b) *p*-Nitrophenol- α -glukosid. 50 g β -Pentacetylglukose werden mit 35 g *p*-Nitrophenol in siedendem Wasserbad erhitzt. Das Gemisch schmilzt bald. 12.5 g Zinkchlorid werden dann zugesetzt und die ganze Masse wird noch eine Stunde unter starkem Rühren erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsprodukt mit 400 cem Benzol ausgelaugt, die Lösung im Scheidentrichter zuerst mit Wasser dann mit 5% iger Natriumcarbonatlösung so oft gewaschen, dass sich die wässrige Schicht nur schwach gelblich verfärbt. Die Benzollösung wird nochmals mit Wasser gewaschen, mit Calciumchlorid getrocknet, unter vermindertem Druck stark eingedampft und der syrupöse Rückstand in heissem Alkohol gelöst und abgekühlt. Tetracetyl-*p*-Nitrophenol- α -glukosid scheidet sich als syrupöse Masse aus. Der überstehende Alkohol wird daher abdekantiert und die Umfällung aus Alkohol

noch zweimal wiederholt. Der Syrup wird dann im Mörser unter Eiskühlung mit zunehmender Menge Wasser durchknetet und die fest gewordene Masse auf der Nutsche gesammelt und getrocknet. 12 g davon werden in 500 ccm Methylalkohol suspendiert und darin wird unter Eiskühlung getrocknetes Ammoniakgas bis zur völligen Auflösung eingeleitet. Nach einer Stunde wird die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft und der Rückstand aus heissem Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute: 3 g farblose nadlige Kristalle ohne Krystallwasser. Schmelzpunkt 210° .

Freies *p*-Nitrophenol war nicht vorhanden. Der Gehalt des gebundenen *p*-Nitrophenols wurde wie oben analysiert. 4.5 mg lieferten 2.09 mg *p*-Nitrophenol, während die Theorie 2.08 mg fordert. Zur $[\alpha]$ -Messung wurde 0.1999 g Substanz in 20 ccm Messkolben in Wasser gelöst.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{2.15 \times 20}{0.1999} = +215^{\circ}$$

Das theoretische $[\alpha]$ wurde nach der Hudsonschen Regel berechnet. Nach diesem Autor ist zwischen der spezifischen Drehung und Konfiguration des Glukosids ein inniger Zusammenhang vorhanden. Man kann sich ein Glukosidmolekül hinsichtlich des Drehungsbetrages in zwei Teile zerlegt denken, nämlich in (A) das glukosidische C-Atom samt Anhang und (B) den Rest des Hexosemoleküls. Aus diesem Grund folgt:

$$\text{Phenol-}\alpha\text{-glukosid (E. Fischer, 1916)} \quad [\alpha]_D^{20} = A + B = +180.3^{\circ}$$

$$\text{Phenol-}\beta\text{-glukosid (E. Fischer, 1916)} \quad [\alpha]_D^{25} = -A + B = -71.9^{\circ}$$

$$\therefore 2B = 108.4^{\circ}$$

$$p\text{-Nitrophenol-}\beta\text{-glukosid} \quad [\alpha]_D^{20} = -98.7^{\circ}$$

Kristallwasserfreies

$$p\text{-Nitrophenol-}\beta\text{-glukosid} \quad [\alpha]_D^{20} = -A' + B = -105^{\circ}$$

$$\therefore A' + B = +213.4^{\circ}$$

p-Nitrophenol- α -glukosid ($A' + B$) soll daher eine spezifische Drehung von 213.4° zeigen.

II. Versuchsanordnung.

Die Zusammensetzung der Versuchslösung war folgende:

$M/1000$ <i>p</i> -Nitrophenol-glukosid	10.0 ccm
Pufferlösung	5.0 „
Fermentlösung	a „
Wasser	5-a „

Als Antisepticum wurden einige Tröpfchen Toluol zugesetzt. Als Puffer wurde $M/2$ Essigsäure-Acetat, $M/10$ Phosphat, $M/10$ Glykokoll-Natron verwendet. P_H wurde an der Versuchslösung mittels Indikatorpapiers gemessen. Die Versuchstemperatur betrug das ganze Experiment hindurch 37° . Zur Messung der Hydrolyse wurden 5.0 ccm Versuchslösung in ein Reagenzglas genommen, dieselbe Menge 10% iger Trichloressigsäure hinzugesetzt und filtriert. So beträgt im Filtrat die Konzentration des gesamten *p*-Nitrophenols $M/4000$. Dann wurden 5.0 ccm davon in einen 10.0 ccm fassenden Messzylinder pipettiert, durch Zusatz von 4.0 ccm gesättigten Natriumcarbonats alkalisch gemacht und mit Wasser auf 10.0 ccm aufgefüllt. Je nach der dabei auftretenden Verfärbung wurde als Vergleichslösung 5.0 oder 1.0 ccm $M/4000$ *p*-Nitrophenollösung verwandt, die ebenfalls alkalisiert und auf 10.0 ccm aufgefüllt wurde. Den Hydrolysegrad kann man kolorimetrisch leicht bestimmen. Zur Kolorimetrie des *p*-Nitrophenols siehe die Mitteilung von Tanaka (1938).

III. Versuche.

I) Versuch mit Emulsin.

a) $M/1000$ <i>p</i> -Nitrophenol- β -glukosid	10.0 ccm
Pufferlösung	5.0 „
0.2% Emulsin	2.0 „
Wasser	3.0 „

	P_H 3	P_H 4	P_H 5	P_H 6	P_H 7	P_H 8
1 Std.	39.6%	54.1%	68.5%	76.0%	67.0%	21.2%
3 Std.	49.0%	76.0%	79.0%	81.5%	79.0%	40.5%

Dieselbe Emulsinlösung wurde unter Toluolzusatz bei 37° 2 Tage aufbewahrt. Die Wirkung dieser Lösung auf das β -Glukosid wurde vor und nach Dialyse gegen destilliertes Wasser untersucht. Zusammensetzung der Versuchslösung ist wie oben.

b) vor Dialyse.

	PH 3	PH 4	PH 5	PH 6	PH 7	PH 8	PH 9
1 Std.	22.5%	39.5%	60.1%	68.1%	44.3%	11.5%	Spur
3 Std.	41.0%	56.8%	71.0%	76.1%	69.0%	16.8%	5.1%

c) nach Dialyse.

	PH 3	PH 4	PH 5	PH 6	PH 7	PH 8	PH 9
1 Std.	14.4%	21.1%	41.6%	49.6%	22.3%	Spur	0
3 Std.	16.0%	41.6%	58.5%	69.9%	49.5%	5.3%	Spur

p-Nitrophenol- α -glukosid wurde bei PH 3–8 auch durch frische Emulsinlösung nicht gespalten.

II) Versuch mit der Takadiastase.

a)	<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenol- α -glukosid	10.0 ccm
	Pufferlösung	5.0 „
	5% Takadiastase (nicht dialysiert)	2.0 „
	Wasser	3.0 „

	PH 4,2	PH 5	PH 5,9	PH 7
1 Std.	17.1%	23.4%	17.4%	12.4%
3 Std.	21.0%	29.0%	21.0%	17.0%

b)	<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenol- β -glukosid	10.0 ccm
	Pufferlösung	5.0 „
	1% Takadiastase	2.0 „
	Wasser	3.0 „

	PH 3	PH 4	PH 5	PH 6	PH 7	PH 8
1 Std.	50.8%	66.1%	66.1%	62.9%	44.8%	11.9%
3 Std.	69.9%	82.7%	85.7%	78.0%	66.7%	33.0%

III) Versuch mit Kaninchenorganen.

M/1000 Substrat	10.0 ccm
Pufferlösung	5.0 „
Organsuspension	2.0 „
Wasser	3.0 „

	<i>p</i> -Nitrophenol- α -glukosid	<i>p</i> -Nitrophenol- β -glukosid
	PH 7; 3 Std.	PH 7; 2 Std.
Leber	36.0%	61.0%
Niere	29.6 „	54.7 „
Lunge	15.8 „	0
Milz	37.0 „	0
Hoden	14.9 „	0
Muskel	12.5 „	0

IV) Versuch mit der Kaninchenleber-Suspension.

a) M/1000 <i>p</i> -Nitrophenol- α -glukosid	10.0 ccm
Pufferlösung	5.0 „
Suspension	2.0 „
Wasser	3.0 „

	PH 4	PH 5	PH 6	PH 7	PH 8
1 Std.	6.1%	14.0%	15.8%	22.7%	14.4%
3 Std.	19.0%	25.0%	27.0%	36.0%	24.3%

b) M/1000 <i>p</i> -Nitrophenol- β -glukosid	10.0 ccm
Pufferlösung	5.0 „
Suspension	1.0 „
Wasser	4.0 „

	PH 4	PH 5	PH 6	PH 7	PH 8	PH 9
1 Std.	Spur	63.8%	73.0%	69.9%	59.2%	46.5%
3 Std.	Spur	70.0%	85.5%	82.5%	75.5%	71.0%

e) Versuch mit dem Kaninchenleber-Autolysat.

1. vor Dialyse.

<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenol- β -glukosid	10.0 ccm
Pufferlösung	5.0 „
Autolysat	5.0 „
Wasser	0

	PH 4	PH 5.1	PH 6	PH 7	PH 7.9
1 Std.	Spur	66.5%	79.0%	71.2%	48.5%
3 Std.	Spur	71.2%	82.0%	77.0%	65.5%

2. nach Dialyse.

	PH 4	PH 5	PH 6	PH 7	PH 8
1 Std.	0	14.2%	23.2%	20.5%	10.5%
3 Std.	0	38.1%	68.0%	56.1%	20.1%

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die enzymatische Hydrolyse der α - und β -Glukoside des *p*-Nitrophenols wurde untersucht. Zur Ermittlung des Hydrolysegrads bediente sich Verf. der Kolorimetrie des abgespaltenen freien *p*-Nitrophenols.

2. *p*-Nitrophenol- α -glukosid krystallisiert in farblosen Nadeln. $F\ 210^\circ$ und $[\alpha]_D^{20} = +215^\circ$.

3. Emulsin spaltet das β -Glukosid optimal bei PH 6, ist aber auf das α -Glukosid unwirksam.

4. Takadiastase spaltet sowohl das α - als auch β -Glukosid. Bei beiden Fällen ist die optimale Azidität PH 5.

5. *p*-Nitrophenol- α -glukosid wird durch Leber, Niere, Milz, Lunge, Hoden und Muskel des Kaninchens gespalten. Das Optimum liegt bei PH 7. Durch Autolyse wird aber die tierische α -Glukosidase inaktiviert.

6. β -Glukosid ist aber nur durch Leber und Niere spaltbar. Dialysiertes Leberautolysat ist auch wirksam. Die optimale Azidität beträgt PH 6.

LITERATUR.

- Bass, R. (1912): Zs. f. expt. Path. u. Th., **10**, 124.
Fujita, H. (1939): J. Biochem.
Glaser, E. u. Walwek, W. (1924): Biochem. Z., **145**, 514.
Hatano, J. (1924): Biochem. Z., **151**, 501.
Hattori, Y. (1924): Biochem. Z., **150**, 150.
Helferich, B. u. Peters, O. (1933): J. f. prakt. Chem. N. F., **138**, 281.
Hofmann, E. (1935): Biochem. Z., **281**, 438.
Matsumoto, A. (1928): Act. Scholae Med. Kioto., **10**, 285.
Morimoto, K. (1937): J. Biochem., **26**, 259.
Ohmori, Y. (1937): Enzymologia, **4**, 217.
Tanaka, S. (1938): J. Biochem., **28**, 119.
Willstätter, R. (1921): Z. physiol. Chem., **117**, 173.

ÜBER DIE STEREOISOMERIE DER γ -AMINO- β -OXY-BUTTERSÄURE.

VON

MASAJI TOMITA UND YOSHINORI SEIKI.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku
und der pharmazeutischen Abteilung der medizinischen
Fakultät zu Nagasaki.)*

(Eingegangen am 6. Februar 1939)

Zur Konstitutions-Ermittlung des Carnitins hat der eine (Tomita) von uns vor mehreren Jahren die γ -Amino- β -oxy-buttersäure synthetisiert und ihre optisch-aktiven Formen dargestellt. Bei der Spaltung der γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure, $\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CO}_2\text{H}$, mit Hilfe von Brucin stiess man (1927) auf einen besonderen Fall, der von der klassischen Theorie des asymmetrischen Kohlenstoffatoms nicht ohne weiteres erklärt werden kann. Obwohl die γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure nur ein asymmetrisches Kohlenstoffatom besitzt, konnten daraus durch asymmetrische Synthese je zwei rechtsdrehende und zwei linksdrehende Enantiostereomere erhalten werden, die sich nach Schmelzpunkt, Löslichkeit und optischer Aktivität verschieden verhalten. Die Isomerie überdauerte auch die Abspaltung des Benzoyls mit Bromwasser, so dass vier aktive Formen der γ -Amino- β -oxy-buttersäure und zwar zwei Paare von Antipoden dargestellt werden konnten.

Bei der Nachprüfung dieser Arbeit haben M. Bergmann und sein Mitarbeiter (1930) in Übereinstimmung mit unserer Angabe festgestellt, dass die γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure, die nur ein asymmetrisches Kohlenstoffatom hat, in festem Zustand in vier optisch-aktive Formen von verschiedenem Drehungsvermögen gespalten wird.

Welcher Teilvorgang nun für das Auftreten der vier optisch-aktiven Benzamino- β -oxy-buttersäuren verantwortlich zu machen ist, darüber gehen die Ansichten stark auseinander.

Bergmann und Lissitzin (1930) behaupten, dass von diesen vier aktiven Formen zwei Formen die normalen Antipoden, die beiden überzähligen Isomeren dagegen Molekülverbindungen der beiden Antipoden seien, von denen die eine den einen Antipoden, die andere den anderen im Überschuss enthält, so dass sie beide noch optisch aktiv seien.

Die wichtigsten Eigenschaften der vier γ -Benzamino- β -oxy-buttersäuren zeigt Tabelle I.

TABELLE I.

Benennung nach		Eigenschaften	
Tomita u. Sendju	Bergmann u. L.	$[\alpha]_D^{20}$	Schmp. uncorr.
<i>l</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure I	<i>l, l, d</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure	-7,5 ($n/2$ NaOH)	172°
<i>d</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure I	<i>d, d, l</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure	+4,1 ($n/2$ NaOH)	178°
<i>l</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure II	<i>l</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure	-11,8 (H ₂ O) -22,0 ($n/2$ NaOH)	114° (wasserfrei) 81° (+1 H ₂ O)
<i>d</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure II	<i>d</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure	+10,1 (H ₂ O) +22,0 ($n/2$ NaOH)	114° (wasserfrei) 80° (+1 H ₂ O)

Nach Bergmann und Lissitzin zeigt *l*- γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure II in $n/2$ Natronlauge eine fast genau 3-mal so hohe spezifische Drehung wie die *l*- γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure I unter denselben Umständen. Diese Beobachtungen stützen ihre Auffassung damit, dass es sich bei den γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure I um Molekülverbindungen aus 1 Äquivalent aktiver Säure mit 1 Äquivalent *d, l*-Säure handelt.

Wären, wie Bergmann und Lissitzin vermuteten, die überzähligen Isomeren der γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure wirklich Molekülverbindungen, so müssten die daraus sich ableitenden überzähligen γ -Amino- β -oxy-buttersäuren I auch Molekülverbindungen aus 1 Äquivalent aktiver γ -Amino- β -oxy-buttersäure mit 1 Äquivalent *d, l*- γ -Amino- β -oxy-buttersäure sein und ihre spezifische Drehung müsste genau $1/3$ derjenigen der γ -Amino- β -oxy-buttersäuren II betragen. Dies ist aber nicht der Fall. Die spezifische Drehung der freien γ -Amino- β -oxy-buttersäuren I in

Wasser beträgt $\pm 3,3^\circ$, während die der Säuren II $18,3^\circ$ – $21,0^\circ$ ergibt.

Durch pH-Bestimmung der beiden Säuren (I und II) konnten wir feststellen, dass die Auffassung der aktiven γ -Benzamino- β -oxy-buttersäuren I als Molekülverbindungen irrtümlich ist. Nach unseren wiederholten Untersuchungen unterscheiden sich die beiden Säuren (I und II) in ihren pH-Werten selbst in m/100-Lösung noch deutlich (Tabelle II).

TABELLE II.

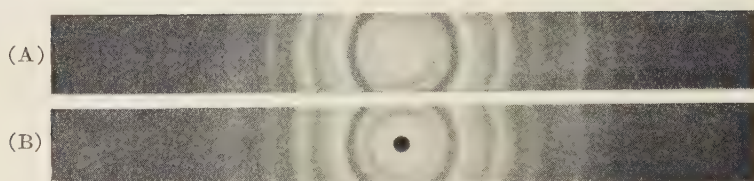
Substanz	Konzentration	pH	
		Sofort	nach 1 Stde.
<i>l</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure I	0,0223 g in 10 ccm H ₂ O (= 1/100-m. Lösung)	2,3	2,3
<i>l</i> - γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure II	"	2,8	2,8

Zwischen den normalen Säuren und ihren Molekülverbindungen dürfte kein Unterschied der Acidität vorhanden sein.

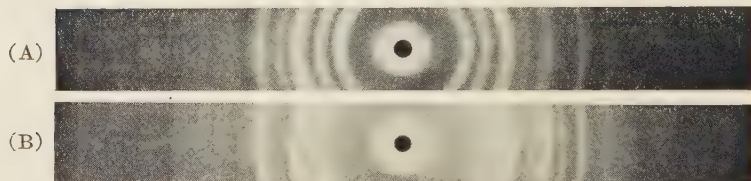
Um einen tieferen Einblick in diese Isomerisation zu erhalten, haben wir die beiden Antipoden-Paare der freien γ -Amino- β -oxy-buttersäure und der Benzoylverbindung einerseits mit Hilfe der Absorptions-Spektroskopie und andererseits der röntgenographischen Methode untersucht. Die Versuche nach dem ersten Verfahren bestätigten den Unterschied der Struktur der Verbindungen I und II nicht. Nach Debye-Scherrers Pulver-Verfahren erhielt man die den beiden Verbindungen typischen Interferenz-Erscheinungen, was für unsere Anschauung spricht.

Dass ein Antipoden-Paar die gleiche Interferenz-Erscheinung zeigt, während geometrische Isomere ungleiche Röntgenbilder geben, wurde einerseits bei *d*- und *l*-Adrenalin (Abbild. 1) und andererseits bei Fumar- und Maleinsäure (Abbild. 2) festgestellt.

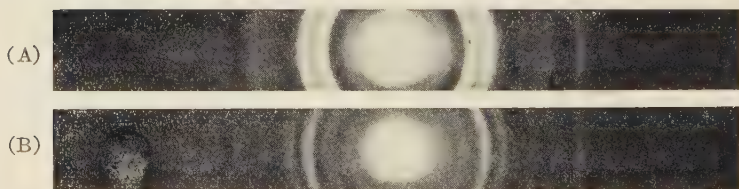
Wie man in Abbild. 3. sieht, sind die Diagramme von *l*- γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure I und *l*- γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure II ganz verschieden. Es unterliegt also keinem Zweifel, dass die beiden Säuren (I und II) verschiedene Struktur haben.



Abbild. 1. (A) *l*-Adrenalin
(B) *d*-Adrenalin



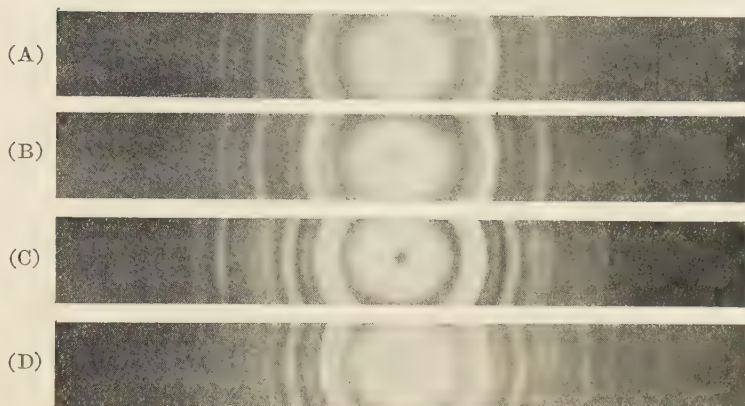
Abbild. 2. (A) Maleinsäure
(B) Fumarsäure



Abbild. 3.
(A) *l*- γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure I
(B) *l*- γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure II

l- γ -Amino- β -oxy-buttersäure I und *d*- γ -Amino- β -oxy-buttersäure I zeigen ein ganz identisches Röntgenbild. Sie sind also ein Antipoden-Paar. Das gleiche gilt auch für II-säuren. γ -Amino- β -oxy-buttersäure I und γ -Amino- β -oxy-buttersäure II zeigen aber ganz ungleiche Bilder, weil ihre Struktur verschieden ist. (Abbild. 4.)

Durch Ausmessung der Diagramme können wir der γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure II eine Längenausdehnung von ungefähr 8,7 Å und der γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure I von 12,4 Å zuerteilen. Diese Tatsache bietet für die Konstitutions-Ermittlung der γ -Benzamino- β -oxy-buttersäure II vom Schmp. 114° den besten



Abbild. 4.

- (A) *l*- γ -Amino- β -oxy-buttersäure I.
- (B) *d*- γ -Amino- β -oxy-buttersäure I.
- (C) *l*- γ -Amino- β -oxy-buttersäure II.
- (D) *d*- γ -Amino- β -oxy-buttersäure II.

Anhaltspunkt, denn die unter Zugrundlegung der bekannten Atomdurchmesser für Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff berechneten Länge der betainartigen Ringformel stimmt mit dem gefundenen Wert überein.

Wir haben auch die Diagramme von *l*- und *d*- γ -Amino- β -oxy-buttersäure I und *l*- und *d*- γ -Amino- β -oxy-buttersäure II ausgemessen und fanden, dass die Säure I eine offene Kettenstruktur, die Säure II Ringform besitzt. Es ist anzunehmen, dass die Längenausdehnung von γ -Amino- β -oxy-buttersäure I etwa 7,3 Å und die von γ -Amino- β -oxy-buttersäure II etwa 3,2 Å beträgt.

Damit wird angenommen, dass eine Aminosäure in zwei desmotropen Formen isoliert werden kann.

LITERATUR.

- Bergmann, M. u. Lissitzin, M. (1930): B. **63**, 310.
 Tomita, M. u. Sendju, Y. (1927): H-S **169**, 263.

ÜBER DIE STEREOISOMERIE DES ISOSERINS.

VON

YOSHINORI SEIKI.

(Aus der pharmazeutischen Abteilung der medizinischen
Fakultät zu Nagasaki.)

(Eingegangen am 6. Februar 1939)

Vor mehreren Jahren haben E. Fischer und W. Koelker (1905) beim Aufbau von Leucyl-isoserin aus inaktiven Komponenten zwei isomere Racemkörper erhalten. Das gleiche Resultat bekamen sie weiter bei der Prüfung des α -Brom-isocapronyl-isoserins und des Hippuryl-isoserins. Könnte nun die Isomerie durch eine Verschiedenheit der Peptidstruktur, entweder durch Säureamidverkettung oder Esterbindung bedingt sein, so dürfte man einen erheblichen Unterschied in der Basizität und der dadurch bedingten Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure, sowie in der Einwirkung der salpetrigen Säure erwarten. Der Versuch der genannten Forscher hat aber gezeigt, dass dies nicht der Fall ist, dass sich vielmehr beide Körper genau so wie die gewöhnlichen Dipeptide verhalten. Es unterliegt also keinem Zweifel, dass die Isomerisation der racemischen Dipeptide auf dem sterischen Verhalten des Isoserins basiert.

Später haben M. Tomita und seine Mitarbeiter (1932) bei der asymmetrischen Synthese des Benzoyl-isoserins ausser den normalen Antipoden noch ein anderes Antipoden-Paar dargestellt, welches nach der Analyse die Bruttoformel $C_{20}H_{24}N_2O_7$ hat und durch Spaltung in Benzoesäure und Isoserin zerlegt wird. Bei der Hydrolyse an freien Aminosäuren haben sie aber nur zwei aktive Formen und zwar ein Antipoden-Paar des Isoserins bekommen. Die Isomerie überdauert also die Abspaltung des Benzoyls mit Bromwasserstoff nicht mehr.

Welcher Teilvorgang nun für das Auftreten der vier optisch-aktiven Benzoyl-isoserine verantwortlich zu machen ist, und wie die Isomerisation beim Aufbau von Leucyl-, Brom-isocapronyl-

isoserin entsteht, das ist bis heute gar nicht berücksichtigt.

Dank vor allem einer röntgenographischen Methode von Debye und Scherrer (1917) ist die Isomerisation von γ -Amino- β -oxy-buttersäure und ihrer Benzoylverbindung klarer zutage getreten (1939). Wir haben die Brauchbarkeit dieser Methode seitdem näher untersucht und gefunden, dass dieselbe in vielen Fällen wegen der Leichtigkeit der Handhabung und der Genauigkeit der Identifizierung für die Erkennung und Unterscheidung der einzelnen Verbindungen vorzuziehen ist.

Einer Aufforderung von Herrn Prof. M. Tomita folgend, habe ich das Verhalten des Isoserins bei der asymmetrischen Synthese nach der Pulvermethode von Debye und Scherrer röntgenographisch untersucht.

Zur leichteren Übersicht seien die wichtigsten Eigenschaften des Antipoden-Paars von Isoserin und ihrer Benzoylverbindungen nach der Angabe von Tomita und seinen Mitarbeitern tabellarisch zusammengestellt:

N-Benzoyl-Verbindungen					Freie Aminosäuren		
	Löslichkeit in Wasser	Schmp.	$[\alpha]_D^{20}$	Ba-Salz		$[\alpha]_D^{20}$	Schmp.
<i>l</i> -Verbind. I	l.l.	110°	-11,26°	Fp=273°	<i>d</i> -Isoserin	+29,68*	185°
<i>l</i> -Verbind. II	w.l.	75°	-30,03° (60% Al.)	kein Ba-Salz	<i>d</i> -Isoserin	+30,68°	196°
<i>d</i> -Verbind. I	l.l.	110°	+11,31°	Fp=276°	<i>l</i> -Isoserin	-32,05°	195°
<i>d</i> -Verbind. II	w.l.	75°	+29,46° (60% Al.)	kein Ba-Salz	<i>l</i> -Isoserin	-29,83°	195°

Wie man aus Fig. 1. ersieht, sind die Diagramme der Röntgenographie von *l*-Verbindung I (Benzoyl-*d*-isoserin) und *d*-

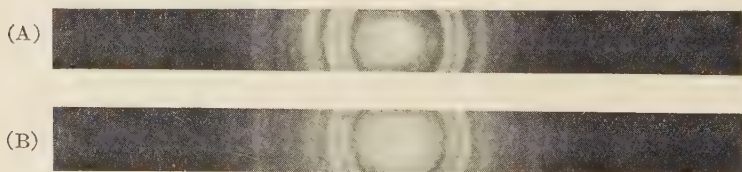


Fig. 1. (A) *l*-Verbindung I (Benzoyl-*d*-isoserin)
(B) *d*-Verbindung I (Benzoyl-*l*-isoserin)

Verbindung I (Benzoyl-*l*-isoserin) ganz identisch. Es unterliegt also keinem Zweifel, dass sie ein Antipodenpaar sind.

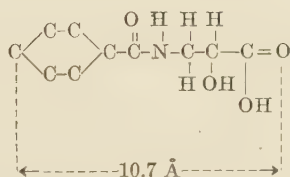
Das gleiche gilt auch für *l*- und *d*-Verbindung II. Fig. 2. zeigt die Diagramme der *l*- und *d*-Verbindung II.



Fig. 2. (A) *l*-Verbindung II ($C_{20}H_{24}N_2O_7$)
(B) *d*-Verbindung II ($C_{20}H_{24}N_2O_7$)

Aus beiden Figuren erkennt man sehr deutlich, dass die Diagramme von I und II Verbindungen ganz ungleiche sind. Es führt zu dem Schluss, dass beide Verbindungen, genau so wie in ihren Eigenschaften, als auch in ihren Strukturen ganz verschieden sind.

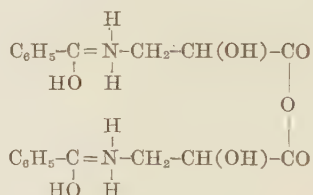
Durch Ausmessung der Diagramme von I und II Verbindungen können wir annehmen, dass die Verbindungen I das normale Antipoden-Paar sind und eine offene Kettenstruktur haben, deren Längenausdehnung ungefähr 10,7 Å beträgt.



Nach den Elementaranalysen der II Verbindung ($C_{20}H_{24}N_2O_7$) ist der Wasserstoffgehalt im Vergleich zu dem normalen Benzoyl-isoserin viel höher. Diese Tatsache hat Tomita durch die Gegenwart von fünfwertigen N-Atomen zu erklären versucht. Bekanntlich zeigt die Atomgruppe $O=C-N-H$ leicht die Erscheinung der Tautomerie und der Stickstoff der umgewandelten Enolform ist bei der Anlagerung von zwei Wasserstoffatomen aus dem dreiwertigen in den fünfwertigen Zustand übergegangen. Die Analysendaten

zeigten uns auch, dass die Substanz von $C_{20}H_{24}N_2O_7$ eine Anhydridverbindung von zwei Molekülen Benzoylisoserin ist. Nach Tomita und seinen Mitarbeitern bietet das Isoserin bei der Veresterung, im Gegenteil zu ω -Amino-oxyssäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen, eine Sonderstellung dar, in sofern als es dabei keine intramolekulare Säureamidverbindung bildet. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass sich bei der Anhydrisierung der Benzoyl-isoserine keine intramolekulare Verkettung zwischen Carboxyl- und Aminogruppe, sondern eine Säureanhydridbildung aus beiden Carboxylgruppen vollzieht.

Eine zusammenfassende Betrachtung drängt zu der Schlussfolgerung, dass die Substanz von $C_{20}H_{24}N_2O_7$ wahrscheinlich die folgende Struktur hat:



Wenn beide Benzoylisoserin-Komponenten mit fünfwertigem N-Atom unter sich in offener Kette durch ein Atom Sauerstoff vereinigt sind, und unter einen Valenzwinkel von rund 110° mit dem Zentralatom verbunden sind, so muss die Substanz eine Längenausdehnung von $16,2 \text{ \AA}$ haben. Diese Zahl stimmt mit einer ungefähren Längenausdehnung gut überein, die durch Ausmessung der Diagramme der II Verbindungen ($C_{20}H_{24}N_2O_7$) zuerteilt wurde.

Bei der Hydrolyse der vier Benzoylderivate des Isoserins haben Tomita und seine Mitarbeiter nur zwei aktive Formen der Aminosäuren bekommen, die in Löslichkeit, Schmelzpunkt und optischer Aktivität mit den aktiven Isoserinen von E. Fischer und W. Jacobs (1905) übereinstimmen.

Nach meiner röntgenographischen Untersuchungen sieht man, dass das Röntgenbild des aus beiden *l*-Verbindungen erhaltenen rechtsdrehenden Isoserins ganz identisch ist. Das gleiche gilt

für die linksdrehende Aminosäure. Die Diagramme des rechtsdrehenden und linksdrehenden Isoserins ist auch ganz gleich. Man kann nun ungezwungen sagen, dass die erhaltenen *d*- und *l*-Isoserine ein Antipoden-Paar sind. (Fig. 3.)

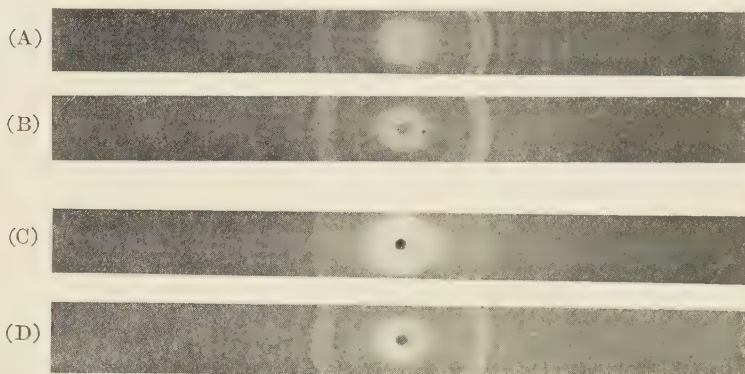
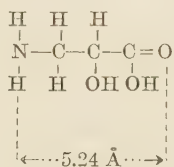


Fig. 3. (A) *d*-Isoserin aus *l*-Verbindung I
(B) *d*-Isoserin aus *l*-Verbindung II
(C) *l*-Isoserin aus *d*-Verbindung I
(D) *l*-Isoserin aus *d*-Verbindung II

Es ist anzunehmen, dass die Längenausdehnung von aktiven Isoserinen etwa 5.24 Å beträgt und sie offene Kettenstruktur haben.



Wir konnten hierbei die Angaben von Tomita und seinen Mitarbeitern über die Isomerisation des Isoserins, die von der klassischen Theorie des asymmetrischen Kohlenstoffatoms nicht ohne weiteres erklärt werden kann, durch röntgenographische Untersuchungen klarer auffassen.

Die Versuche, das Auftreten der racemischen Isomere des Leucyl-, α -Brom-isocapronyl- und Hippuryl-isoserins durch Röntgenographie nach Debye und Scherrer aufzuklären, sind im Gang.

LITERATUR.

- Debye, P. u. Scherrer, P. (1917): Phys. Zs. **18**, 291.
Fischer, E. u. Jacobs, W. (1905): B. **40**, 1057.
Fischer, E. u. Koelker, W. (1905): A. **340**, 172.
Tomita, M. u. Mitarbeiter (1932): H-S **211**, 38.
Tomita, M. u. Seiki, Y. (1939): vorangehende Mitteilung.

SYNTHESE EINES HOCHMOLEKULAREN OXY-METHYLFURFUOLDERIVATES.

VON

TOSHINORI ISEKI UND TSUKOURU SUGIURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.

Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 6. Februar 1939)

Nach neueren Anschauungen sollten alle Polyosen nicht, wie man bisher annahm, aus langen Ketten strukturell verbundener Monosenreste aufgebaut sein, sondern aus verhältnismässig einfachen Grundkörpern, z. B. Anhydriden, bestehen. Verschiedene krystallisierte Amylosen wurden als Abbauprodukte der Stärke isoliert, deren Natur lange unerkannt blieb, bis Karrer den Beweis erbringen konnte, dass in der Diamylose ein Maltoseanhydrid vorliegt. Er fasst die α -Tetra- und α -Oktaamylose als polymere Formen der Diamylose auf. Die β -Hexaamylose ist nach ihm ein Dimeres der Triamylose.

Wenn man andererseits auf dem Weg der Synthese durch Polymerisation niedermolekularer Grundkörper eine Gruppe hochmolekularer Stoffe bekommt, so können beide auf den genannten Arbeitsgebieten erhaltenen Resultate sich gegenseitig ergänzen und zu einem einheitlichen Ganzen durchdringen.

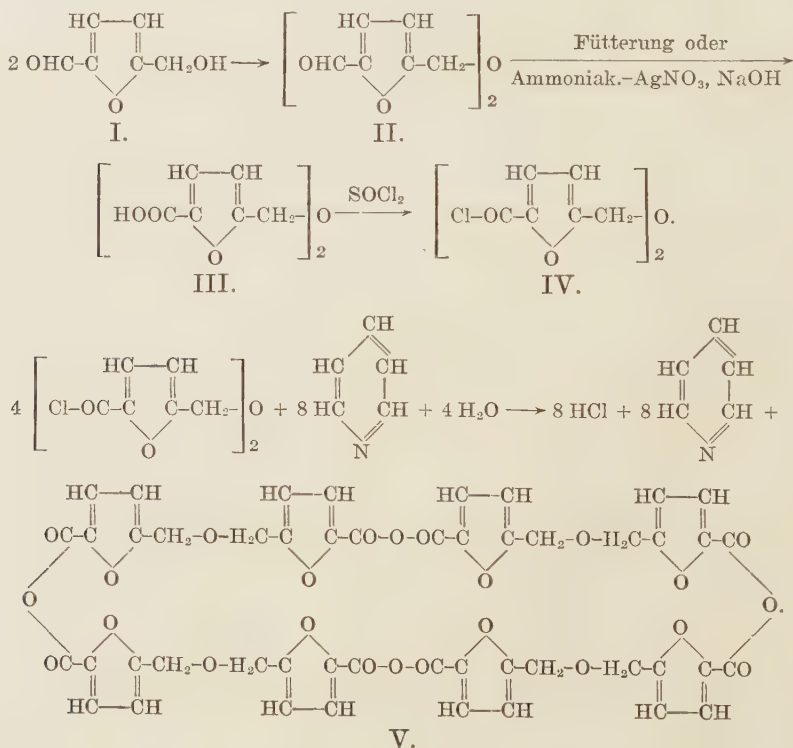
Durch Anhydrisierung des Zuckers vermindert sich die Zahl der hydrophilen Hydroxylgruppe des Zuckermoleküls und dementsprechend nimmt die Verbindung ihre Tendenz zur Krystallisation zu. Indem man das Oxymethylfurfurol, ein Furanoseanhydrid, als Ausgangsmaterial verwendet, kann ein hochmolekulares Zuckerderivat verhältnismässig leicht dargestellt werden.

Durch Fütterung von Di-(furfurol-methyl-2-)-äther, der beim Erwärmen des Oxymethylfurfurols leicht herzustellen ist, wird der Bis-(Carboxy-furanmethyl-2-)-äther in mehr als 50% Ausbeute aus dem Harn der Versuchstiere erhalten (1933).

Synthetisch wird diese Dicarbonsäure aus Di-(furfurol-

methyl-2)-äther dargestellt, indem man auf diese Verbindung bei Gegenwart von Natronlauge ammoniakalische Silbernitratlösung einwirken lässt. Bis-(Carboxy-furan)-methyl-äther wird mit Thionylechlorid in Säurechlorid umgewandelt. Löst man das hier erhaltene Säurechlorid in Pyridin, und giesst es in Wasser, so scheidet sich eine gelbliche Masse aus, die durch Waschen fest wird. Diese Verbindung wird nach den Analysen als ein aus 4 Molekülen Säurechlorid unter Salzsäureabspaltung kondensiertes Säureanhydrid, d. i. Tetra-(Brenzschleimsäureanhydrid-methyl-2)-äther angenommen.

Die sich vollziehenden Reaktionen können durch folgende Schema wiedergegeben werden:



BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Synthese von Bis-(carboxy-furan)-methyläther (III).

Die Synthese gelang nach der von Einhorn (1893) angegebenen Methode: In jedem Versuch werden 8,5g Di-(furfurol-methyl-2)-äther in 2l Wasser suspendiert, dazu 100ccm 30-proz. Silbernitratlösung und 50ccm 20-proz. Natronlauge hinzugegeben. Durch Zusatz von konz. Ammoniak löst man das ausgefällte Silberoxyd bis auf einen geringen Rest auf. Man lässt die Flüssigkeit 3 Tage lang bei Raumtemperatur unter zeitweisem Umrühren stehen, dabei bildet sich ein prächtiger Silberspiegel. Die Lösung wurde alsdann mit verd. Schwefelsäure angesäuert, und vom entstandenen Silbersulfat befreit. Das etwas bräunlich gefärbte Filtrat wird 2-mal mit Essigäther extrahiert, der Essigätherextrakt wird nach dem Verdunsten in verd. Alkohol gelöst und mit Tierkohle gereinigt. Daraus scheiden sich nadelförmige Krystalle. Dieser Krystall ist mit dem Bis-(Carboxy-furan)-methyl-äther ganz identisch, der bereits vor einigen Jahren von Iseki (1933) durch Fütterung von Di-(furfurol-methyl-2)-äther an Kaninchen, Hunde und Hühner gewonnen wurde.

Wenn man nun das Filtrat von Silbersulfat mit 50-proz. Schwefelsäure versetzt, so kann man ohne Verwendung der Essigätherextraktion fast reine Krystalle von Bis-(Carboxy-furan)-methyl-äther erhalten. Schmp. 209–210°. Ausb. immer über 85% d. Th.

3.745 mg Sbst.: 7.420mg CO₂, 1.245mg H₂O.

C₁₂H₁₀O₇. Ber. C 54,12 H 3,78

Gef. " 54,04 " 3,72.

Monomethylester: 2g Dicarbonsäure werden 4 Stdn. mit 25 ccm absol. Methanol unter Zusatz von 0,5 ccm konz. Schwefelsäure auf dem Wasserbad unter Rückfluss erhitzt. Am nächsten Tage wurde die ausgeschiedene Krystallmasse (enthält 0,74g Dimethylester) abgesaugt und mit Methanol gut ausgewaschen. Hierbei wurde die vereinigte Methanollösung im Vak. eingedampft, und der Rückstand in verd. Na₂CO₃-Lösung aufgenommen, und dann mit Schwefelsäure gefällt. Nach dem Absaugen

und Trocknen wurde die Fällung mit kaltem Chloroform ausgezogen. Dabei blieben 0,26 g nicht veresterte Säure zurück. Der in Chloroform lösliche Monoester wurde durch Abdampfen der Lösung gewonnen. Durch Wiederholung obiger Behandlung und Umlösung aus verd. Methanol wurde der reine Monoester in Form von Säulen oder Stäbchen erhalten, ihre Schmp. 144–146°. Ausb. 0,69 g.

Der saure Monoester ist in Ligroin und Petroläther unlöslich, aber in Alkalien, heissem Wasser und allen organischen Lösungsmitteln löslich.

3,945 mg Sbst.: 8,050 mg CO₂, 1,530 mg H₂O.

C₁₃H₁₂O₇. Ber. C 55,71 H 4,28

Gef. " 55,65 " 4,34.

Darstellung des Säurechlorides (IV).

15 g Bis-(Carboxy-furan)-methylläther werden mit 35 g Thionylchlorid auf dem Wasserbad am Rückflusskühler gekocht, bis die Dicarbonsäure langsam in Lösung übergeht. Das überschüssige Thionylchlorid wird dann unter vermindertem Druck verdunstet, und der schwärzliche Rückstand mit wasserfreiem Benzol aufgenommen. Aus dem Benzolextrakt erhielten wir nach mehrmaligem Umkrystallisieren mit Tierkohle fast farblose nadelförmige Krystalle, welche gegen 98–99° schmolzen. Dass es sich bei der so erhaltene Substanz um Bis-(Brenzschleimsäure-chlorid)-methylläther handelte, wurde durch folgende Bestimmung bestätigt.

Das Säurechlorid ist in Wasser unlöslich, in Aceton, Benzol, Chloroform, Eisessig, Äther und Essigäther gut löslich. Ausb. 100% d. Th.

3,390 mg Sbst.: 5,930 mg CO₂, 0,840 mg H₂O.

C₁₂H₈O₅Cl₂. Ber. C 47,53 H 2,66

Gef. " 47,71 " 2,77.

Dimethylester: Kocht man 2–3 Min. das Säurechlorid mit 3–4-facher Menge Methanol, so bildet sich sofort der Ester, der nach dem Umkrystallisieren aus heissem Methanol bei 154° schmilzt. Ausb. 100%. Der Ester ist in Wasser unlöslich, schwer in heissem Methanol, leichter in Chloroform, Aceton und Eisessig.

3.505 mg Sbst.: 7.350 mg CO₂, 1.450 mg H₂O.

C ₁₄ H ₁₄ O ₇ .	Ber.	C 57.12	H 4.79
	Gef.	" 57.19	" 4.63.

Diäthylester: Aufgearbeitet wie beim Dimethylester, ihr Schmp. 71°. Ausb. 100%. Er ist in Wasser nicht, aber in allgemeinen Lösungsmitteln löslich.

4.055 mg Sbst.: 8.885 mg CO₂, 2.040 mg H₂O.

C ₁₀ H ₁₈ O ₇	Ber.	C 59.62	H 5.59
	Gef.	" 59.76	" 5.63.

Bis-(Brenzschleimsäure-β-chloräthylester)-methyläther: 3 g Säurechlorid werden mit 10 g Äthylenchlorhydrin 1½ Stdn. bei 120–125° im Ölbad erhitzt, so dass die Reaktion unter heftiger Entwicklung von Salzsäuregas verläuft. Man giesst darauf die Reaktionsflüssigkeit in Wasser ein und wäscht das entstandene Öl mit erneuertem Wasser soweit aus, bis das Waschwasser keine Chloridreaktion mehr gibt. Das Öl wird in ätherischer Lösung mit Tierkohle gereinigt und schliesslich über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Verdunsten des Äthers im Exsikkator scheiden sich die Krystalle in Schuppen aus. Schmp. 78–79°. Ausb. 3 g. Er ist in Wasser nicht, aber in allgemeinen Lösungsmitteln sehr leicht löslich.

3.957 mg Sbst.: 7.123 mg CO₂, 1.400 mg H₂O.

C ₁₈ H ₁₆ O ₇ Cl ₂ .	Ber.	C 49.08	H 4.12
	Gef.	" 49.09	" 3.96.

Kondensation des Säurechlorides bei Gegenwart von Pyridin (V).

Zu einer Lösung von 0,909 g Säurechlorid in der passenden Menge Aceton wurden 0,48 ccm Pyridin zugetropft. Man giesst die Mischung unter Umrühren in eiskaltes Wasser ein, wobei sofort eine Trübung entsteht. Nach 1 tägiger Aufbewahrung bei 0° wurde die sich absetzende Fällung abgesaugt, und zuerst mit Wasser, dann mit heissem Benzol und heissem Aceton gründlich ausgewaschen. Das hierbei erhaltene hellgelbe Pulver, welches von Chlorid- und Stickstoffreaktion befreit ist, entspricht einem Tetra-(Brenzschleimsäureanhydrid-methyl-2-)-äther; ihr Schmp.

165–167°. Ausbeute 0.52 g. Dieser Stoff ist in Wasser und in allen organischen Lösungsmitteln unlöslich.

3.860 mg Sbst.: 8.215 mg CO₂, 1.200 mg H₂O.

C₄₈H₃₂O₂₄: Ber. C 58,03 H 3,24

Gef. " 58,04 " 3,47.

Das Molekulargewicht der Substanz wurde nach Rast bestimmt.

0.571 mg Sbst. in 5,955 mg Campher: $\Delta = 4.0^\circ$

1.800 mg Sbst. in 15.5 mg Campher: $\Delta = 4.5^\circ$.

Ber. 992.

Gef. 960, 1033.

LITERATUR.

Einhorn, A. (1893): B. **26**, 454.

Iseki, T. (1933): H-S **216**, 132.

ZUR KENNTNIS DER ZUCKER-AMINOSÄURE- VERBINDUNGEN.

VON

TOSHINORI ISEKI UND TSUKOURU SUGIURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 6. Februar 1939)

Es sind verschiedene Typen für Zuckeramino­säure-Verbindungen denkbar. Am besten bekannt sind *N*-Glykoside der Aminosäuren, die einerseits von Euler (1931), Maurer (1926) und anderen (1932) und andererseits von Helferich und Mittag (1938) erforscht wurden. Eine weitere Möglichkeit der Verbindung zwischen Zucker und Aminosäuren, das *O*-Glykosid ist von Clutton, Harington und Mead (1937) hergestellt und zu interessanten Versuchen verwandt worden.

Iseki (1933) hat vor einigen Jahren geplant, Verbindungen der Oxymethylfurfurol­derivate, die gleichzeitig Zucker und Aminosäuren sind, herzustellen und ihre Eigenschaften zu untersuchen. Zunächst hat er das Oxy-methyl-furyl-alanin synthetisiert und für eine weitere Möglichkeit der Verbindung zwischen Zucker und Aminosäuren einen Beitrag geliefert.

Um die Reaktionsmöglichkeiten des Oxymethylfurfurols gegen Aminoverbindungen zu prüfen, haben wir verschiedene Kondensationsprodukte zwischen Oxymethylfurfurol und *N*-haltigen Verbindungen hergestellt und ihre Eigenschaften studiert, die in der folgenden Tabelle kurz zusammengestellt werden:

	Bezeichnung	Schmp.	Formel
I	$\left[\begin{array}{c} \text{HC} \text{---} \text{CH} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{H}_2\text{N-CO-C} \quad \text{C-CH}_2\text{-O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right]_2$	204°	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_2$

II	$\left[\begin{array}{c} \text{HC}-\text{CH} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C}_6\text{H}_5\text{-NH-CO-C} \quad \text{C-CH}_2\text{-} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right]_2 \text{O}$	169°	$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2$
III	$\left[\begin{array}{c} \text{HC}-\text{CH} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{-NH-CO-C} \quad \text{C-CH}_2\text{-} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right]_2 \text{O}$	239°	$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{N}_2$
IV	$\left[\begin{array}{c} \text{HC}-\text{CH} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{-OOC-CH}_2\text{-NH-CO-C} \quad \text{C-CH}_2\text{-} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right]_2 \text{O}$	107°	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{N}_2$
V	$\left[\begin{array}{c} \text{HC}-\text{CH} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HOOC-CH}_2\text{-NH-CO-C} \quad \text{C-CH}_2\text{-} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right]_2 \text{O}$	223°	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_9\text{N}_2$
VI	$\left[\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HC} \quad \text{C} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HC} \quad \text{C} \quad \text{HC-CH} \\ \parallel \quad \parallel \quad \parallel \\ \text{HC} \quad \text{C} \quad \text{C-CH}_2\text{-} \\ \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH} \quad \text{N} \quad \text{O} \end{array} \right]_2 \text{O}$	251°	$\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{N}_2$

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Bis-(Brenzschleimsäure-amid)-methyl-äther (I).

Zu einer Lösung von 1 g Bis-(Brenzschleimsäure-chlorid)-methyl-äther werden 5 ccm konz. wässer. Ammoniaklösung hinzugegeben und die Mischung im Eisschrank stehengelassen. Nach 14 Tagen werden die auskrystallisierten Massen abgesaugt und ausgewaschen. Die aus absol. Alkohol umkrystallisierten Nadeln schmolzen bei 204°. Ausbeute 98% der Theorie. Dieses Säureamid ist in heissem Wasser, Alkohol und Eisessig löslich.

4,080 mg Sbst.: 8,160 mg CO_2 , 1,610 mg H_2O .

3,390 mg Sbst.: 0,309 ccm N (22°, 765 mm).

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_2$. Ber. C 54,54 H 4,54 N 10,60

Gef. " 54,55 " 4,42 " 10,63.

Bis-(Brenzschleimsäure-anilid)-methyl-äther (II).

1 g Säurechlorid wird in 20 ccm Benzol gelöst und 1,1 g

Anilin versetzt, wobei die Verbindung unter Wärme- und Salzsäureentwicklung sofort auskrystallisiert. Nach Umlösen aus Alkohol erhält man 1,37 g (100% d. Theorie) des Säureanilides vom Schmp. 169°. Dieses Anilid ist gegen Lackmus sauer und löslich in Alkohol, Eisessig, Aceton und Chloroform.

3,480 mg Sbst.: 8.830 mg CO₂, 1,470 mg H₂O.

3,165 mg Sbst.: 0,186 ccm N (22°, 765 mm).

C ₂₄ H ₂₀ O ₅ N ₂ .	Ber.	C 69,24	H 4,84	N 6,72
	Gef.	" 69,20	" 4,73	" 6,85.

Bis-(Brenzschleimsäure-2-oxyanilid)-methyl-äther (III).

Bei Anwendung von o-Oxyanilin erhält man in ähnlicher Weise das Oxyanilid in einer guten Ausbeute. Dieses krystallisiert aus Alkohol in Quadraten vom Schmp. 329°. Das Anilid ist in Wasser unlöslich, in organischen Lösungsmitteln wenig löslich.

2,635 mg Sbst.: 0,137 ccm N (14,5°, 768 mm).

C₂₄H₂₀O₇N₂. Ber. N 6.22 Gef. N 6.24.

Bis-(Pyromykursäure-ester)-methyl-äther (IV).

Hat man 1.4 g (4 Mol) frisch destillierten Glykokollester zu einer Lösung von 1 g (1 Mol) Säurechlorid in eiskaltem Aceton zugetropft, so bildeten sich sofort 0.87 g Glykokollesterechlorhydrat. Nach dem Herausnehmen des Chlorhydrates wird die Acetonlösung ohne Erwärmung bis zur 8 ccm verdunstet. Wenn man der Lösung 20 ccm trocknen Äther zusetzte und mit einem Glasstab reibte, so krystallisierten 1.22 g reinen Bis-(Pyromykursäureester)-methyl-äthers in Nadelchen augenblicklich aus. Der aus Aceton-Äther-Umfällung erhaltene Körper vom Schmp. 107° ist in kaltem Wasser kaum, aber in heissem Wasser und in organischen Lösungsmitteln einschliesslich Äther und Petroläther leicht löslich.

0.0300 g Sbst.: 2.8 ccm 1/20-n-H₂SO₄ (nach Kjeldahl).

C₂₆H₂₄O₆N₂. Ber. N 6.41. Gef. N 6.53.

Bis-(Pyromykursäure)-methyl-äther (V).

Eine Lösung von 0.31 g des vorigen in 50 ccm heissem

Wasser wird 70 Min. mit 14 ccm 0.1-n. Natronlauge auf dem Wasserbad am Rückflusskühler gekocht. Nach Erkalten und Zusatz von 14 ccm 0.1-n. Salzsäure wird die Lösung unter vermindertem Druck bis zur beginnenden Krystallisation eingengt und 3 Stdn. bei 0° aufbewahrt. Aus verd. Alkohol krystallisiert die Substanz in Nadeln vom Schmp. 223°. Ausb. 0.22 g (85% d. Th.). Diese Carbonsäure ist in Wasser schwer, in Alkohol und Eisessig leicht löslich.

3.965 mg Sbst.: 7.380 mg CO₂, 1.580 mg H₂O.

5.771 mg Sbst.: 3.042 ccm 1/100-n H₂SO₄ (nach Kjeldahl).

C ₁₆ H ₁₆ O ₆ N ₂ .	Ber.	C 50.50	H 4.24	N 7.36
	Gef.	" 50.76	" 4.46	" 7.37.

Bis-(2-Cinchoninsäure-5-furan)-methyl-äther (VI).

Zur Lösung von 2,3 g (1 Mol) Di-(furfurol-methyl-2-)-äther in 100 ccm absol. Alkohol und 1,8 g (2 Mol) Brenztraubensäure in 25 ccm absol. Alkohol werden 1,7 g (2 Mol) Anilin, in 25 ccm absol. Alkohol gelöst, allmählich zugegeben. Die Mischung wird 3 Stdn. auf dem Wasserbad am Rückflusskühler erhitzt, wobei sich der bräunlich-gelbliche Krystall schon in der heissen Flüssigkeit bildet. Am nächsten Tage werden die Krystalle (0,75g) abgesaugt und mit absol. Alkohol gewaschen. Wird die Mutterlauge im Vak. zur Sirup verdunstet, mit 100 ccm Aceton versetzt und über Nacht bei 0° aufbewahrt, so erhält man aus der Acetonlösung noch 0,6g gelbe Krystalle. Zur Reinigung werden die vereinigten Krystalle in H₂O-Pyridin gelöst, mit Tierkohle entfärbt und dann mit Essigsäure gefällt. Der aus Pyridin-Essigsäure 3-mal umkrystallisierter Bis-(2-Cinchoninsäure-5-furan)-methyl-äther schmilzt bei 251°, er ist in verd. Alkali- sowie Sodalösung und Pyridin leicht, in Alkohol sehr schwer löslich und in Benzol, Aceton, Essigäther und Eisessig fast unlöslich.

3,890 mg Sbst.: 9,780 mg CO₂, 1,385 mg H₂O.

3,650 mg Sbst.: 0,171 ccm N (26,5°, 763 mm).

0,080 g Sbst.: 3,05 ccm n/10-KOH zur Neutralisation.

C ₃₀ H ₂₆ O ₇ N ₂ .	Ber.	C 69,20	H 3,87	N 5,38	M.-G. 520
	Gef.	" 68,57	" 3,98	" 5,36	" 525.

LITERATUR.

- Clutton, R. F., Harington, Ch. R. u. Mead, Th. H. (1937): Biochem. J. **31**, 764.
Euler, H. v. u. Zeile, K. (1931): A. **487**, 169.
Helfferich, B. u. Mittag, R. (1938): B. **71**, 1585.
Iseki, T. (1933): H-S **216**, 127.
Maurer, K. (1926): B. **59**, 829.
Maurer, K. u. Schiedt, B. (1932): H-S **213**, 110.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER SCHLANGEN.

VON

SHINOBU FUKUDA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 6. Februar 1939)

I

Eine der Hauptbedingungen jeder erfolgreichen Untersuchung der sich entwickelnden Eier ist die peinlich genaue Kenntnis der einschlägigen biochemischen Fragen. Da man bei dem Versuch, diese Aufgabe zu lösen, oft auf die früheren Entwicklungsstufen zurückgreifen und diese zur Erklärung heranziehen muss, und da die winzig kleinen Eier des Menschen und der Säugetiere aus leicht ersichtlichen Gründen kaum Gegenstand einer exakten Untersuchung werden können, so dienen als Hauptobjekt der Untersuchung vornehmlich grobwahrnehmbare, leicht zugängliche und ausserhalb der mütterlichen nutritiven Sphäre sich entwickelnde Eier. Durch eine Reihe ebenso gründlicher wie mühevoller Untersuchungen von Herrn Prof. M. Tomita und seinen Schülern, welche die Entwicklung von Hühner-, Meer- schildkröten-, Hynobius-, Riesensalamander-, Gastropoden- und Cephalopodeneiern betreffen, entspringt eine helle Leuchte für unsere Erkenntnis der Embryochemie. Die in verschiedenen Tierarten allgemein verlaufenden Vorgänge können manchmal für alle Tiere gelten. Man kann also aus den Erfahrungen, die sich durch Studium an oben erwähnten Tieren ergeben, ungefähr vermuten, wie die chemischen Vorgänge im sich entwickelnden Menschenembryonen verlaufen. Wenn die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen lebendgebärenden und Eier legenden Arten genauer verglichen würden, so wäre in der Erkenntnis der Embryochemie der Menschen und Säugetiere ein grosser Schritt vorwärts getan. Dazu ist die Schlange das geeigneteste Unter-

suchungsmaterial, weil die Fortpflanzung dieser Tiere in verschiedener Weise auftritt. Viele Schlangen legen in der Regel eine Mehrzahl von Eiern ab. Viele andere bringen auch lebendige Junge zur Welt, entweder ganz wie die Säugetiere, oder häufiger in der Weise, dass sie die Eier im Mutterleibe so weit auftragen, dass die Jungen die dünnhäutige Eischale zerreißen und bereits vollständig entwickelt geboren werden.

Da es nun äusserst schwer ist, eine zur Untersuchung ausreichende Zahl frisch gelegter Eier zu bekommen und die gelegten Eier künstlich zu bebrüten, so blieb dieses Ei bei dem Studium der Embryochemie, besonders die Bebrütung, bisher ganz unberücksichtigt. Bei einer glücklichen Gelegenheit und nach langen Bemühungen konnte ich im vorigen Sommer ein grosses Quantum frisch gelegter Eier 12 verschiedener Schlangenarten bekommen und habe diese bei meinen chemischen Untersuchungen auf Kohlehydrate, N-haltige Verbindungen, Fettstoffe und Mineralbestandteile verwendet.

Es folgt hier eine Tabelle, die das Gewicht, die Grösse und das Verhältnis von Schale und Inhalt zusammenstellt.

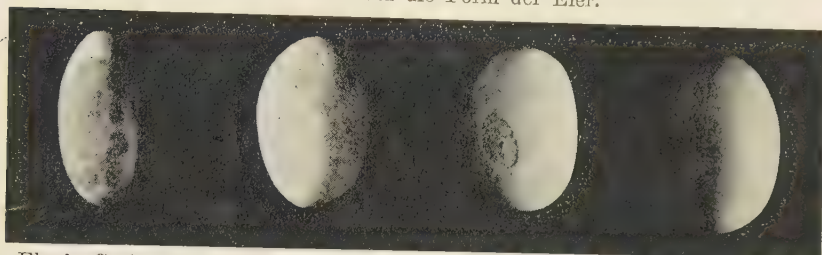
TABELLE I.

Arten der Schlangen	Grösse		Gewicht (g)	Schale		Inhalt (g)
	Länge (cm)	Dicke (cm)		(g)	(%)	
Elaphe Taineurus	4,8	3,0	29,01	4,51	15,5	24,50
Elaphe Carinata	5,2	3,0	26,23	1,97	7,5	24,26
Ptyas Mucosus	4,8	3,0	21,82	2,59	11,8	19,23
Naja Naja Atra	4,8	2,2	14,50	0,62	4,2	13,88
Zaocys Nigromarginatus Oshimai	3,8	2,3	8,61	1,14	13,2	7,47
Ptyas Korros	4,1	2,1	8,26	1,82	22,0	6,44
Bungarus Multicinctus	3,3	1,9	7,92	0,45	5,6	7,47
Trimeresurus Mucrosquamatus	4,1	2,0	7,89	0,25	3,2	7,64
Natrix Piscator	2,7	1,5	2,46	0,10	4,2	2,36
Natrix Annularis	3,0	1,7	4,32	0,08	1,8	4,24
Macropisthodon Rudis Carinatus	1,9	1,1	2,22	0,04	1,8	2,18
Enhydria Plumbea	1,8	1,5	1,08	0,02	1,8	1,06

Die Grösse und die Form der oben geschilderten Schlange-
eier sind aus den beigelegten Bildern ersichtlich.

Abbildung I.

Die Grösse und die Form der Eier.

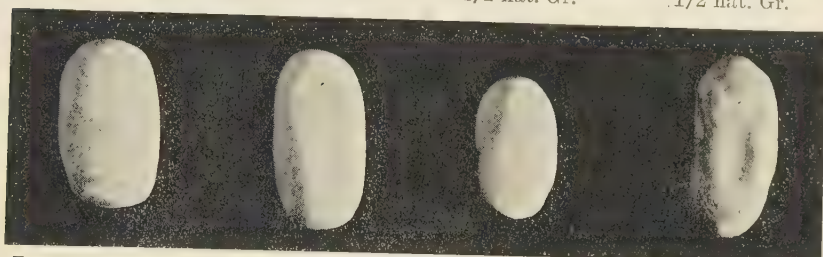


Elaphe Carinata
1/2 nat. Gr.

Elaphe Taineurus
1/2 nat. Gr.

Ptyas Mucosus
1/2 nat. Gr.

Naja Naja Atra
1/2 nat. Gr.



*Zaocys Nigromar-
ginatus Oshimai*
5/8 nat. Gr.

Ptyas Korros
5/8 nat. Gr.

*Bungarus
Multicinctus*
5/8 nat. Gr.

*Trimeresurus
Mucrosquamatus*
5/8 nat. Gr.



Natrix Annularis
2/3 nat. Gr.

Natrix Piscator
2/3 nat. Gr.

Macropistodon Rudis
Carinatus 3/4 nat. Gr.

Euhydrys Plumbea
1/2 nat. Gr.

II

1. *Der Wassergehalt der Schlangeeier.* Zunächst wurde
der Einhalt sorgfältig verdampft und der Wassergehalt bzw. die
Trockensubstanzmenge festgestellt. Dabei zeigt sich folgendes
Resultat. (vgl. Tabelle II)

TABELLE II

Arten der Schlangen	Wassergehalt des Eiinhalt in %	Menge der Trockensubst. in %
Elaphe Taineurus	73,0	27,0
Elaphe Carinata	67,7	32,3
Ptyas Mucosus	69,6	30,4
Naja Naja Atra	74,3	25,7
Zaocys Nigromarginatus Oshimai	81,9	18,1
Ptyas Korros	79,9	20,1
Bungarus Multicinctus	66,9	33,1
Trimeresurus Mucrosquamatus	72,4	27,6
Natrix Piscator	65,5	34,5
Natrix Annularis	72,5	27,5
Macropisthodon Rudis Carinatus	63,3	36,7
Enhydris Plumbea	64,1	35,9

2. *Der freie und gebundene Zucker im Schlangenei.* Was nun den Kohlehydratstoffwechsel bei der Eientwicklung betrifft, so wurde die freie Glukose von Bywaters (1913), Sato (1916), Idzumi (1924) und Tomita (1928), die gebundene Glukose von Sagara (1930) und das Glykogen von Idzumi (1924), Murray

TABELLE III.

Arten der Schlangen	Menge des freien Zuckers im Eiinhalt (%)	Menge des gebundenen Zuckers im Eiinhalt (%)
Elaphe Taineurus	0,0042	0,2438
Elaphe Carinata	0,0035	0,2104
Ptyas Mucosus	0,0038	0,2315
Naja Naja Atra	0,0025	0,3104
Zaocys Nigromarginatus Oshimai	0,0081	0,3683
Ptyas Korros	0,0053	0,3148
Bungarus Multicinctus	0,0061	0,2855
Trimeresurus Mucrosquamatus	0,0029	0,1989
Natrix Piscator	0,0017	0,2423
Natrix Annularis	0,0062	0,3824
Macropisthodon Rudis Carinatus	0,0039	0,1839
Enhydris Plumbea	0,0052	0,3812

(1926) und Kataoka (1931) bei Hühner-, Meerschildkröten- und Amphibieneiern geprüft.

Ich habe die Beantwortung dieser Frage nun beim Schlangenei unternommen. Als Untersuchungsmaterial benutzte ich nur frisch gelegte Eier.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle III enthalten.

3. *N-haltige Verbindungen des Schlangeneies.* Um die Mengenverhältnisse der Reststickstoffformen gegenüber dem Gesamtstickstoff zu finden, habe ich zunächst die Gesamtstickstoffmenge des Eies ermittelt. Das Kreatin und das Kreatinin wurden nach der Enteiweissung mit Schenekscher Lösung nach Folin und Denis kolorimetrisch bestimmt.

Die Befunde sind kurz in Tabelle IV zusammengestellt worden.

Stellt man die Resultate einander gegenüber, so findet sich eine grosse Verschiedenheit der Kreatin- und Kreatininmenge unter einzelnen Schlangenarten. Was die Menge des Gesamt- und Reststickstoffes betrifft, so zeigten sich keine grossen Schwankungen.

TABELLE IV.

Arten der Schlangen	Gesamt-N (%)	Rest-N (%)	Kreatin (%)	Kreatinin (%)
Elaphe Taineurus	3,1752	0,0844	0,0092	0,0029
Elaphe Carinata	2,9802	0,0840	0,0094	0,0029
Ptyas Mucosus	3,1312	0,0826	0,0100	0,0028
Naja Naja Atra	2,2608	0,0596	0,0089	0,0029
Zaocys Nigromarginatus Oshimai	2,3267	0,0602	0,0095	0,0026
Ptyas Korros	3,0688	0,0815	0,0099	0,0032
Bungarus Multicinctus	3,1593	0,0694	0,0102	0,0020
Trimeresurus Mucrosquamatus	2,1957	0,0655	0,0109	0,0031
Natrix Piscator	3,2428	0,0823	0,0101	0,0026
Natrix Annularis	2,2868	0,0620	0,0097	0,0030
Macropisthodon Rudis Carinatus	3,3011	0,0814	0,0096	0,0027
Enhydrys Plumbea	3,1469	0,0786	0,0116	0,0032

4. *Der Gehalt des Schlangeneies an Fettstoffen.* Um gewisse Anhaltspunkt für die Zusammensetzung der Fettsubstanzen

von Schlangeneiern zu erhalten, wurden die sogenannten Kennzahlen ermittelt. Die Bestimmungen ergaben folgende Tabelle. (Tabelle V)

TABELLE V.

Arten der Schlangen	Säure-Z	Vers. Z	M-Reich.	Polensk.	Jod-Z
Elaphe Taineurus	3,74	123,38	0,93	0,33	35,53
Elaphe Carinata	3,66	157,27	0,93	0,73	39,15
Ptyas Mucosus	3,13	147,43	1,32	0,41	37,05
Naja Naja Atra	9,24	193,98	0,78	0,49	36,73
Zaocys Nigromarginatus Oshimai	3,08	185,32	1,58	0,95	38,88
Ptyas Korros	4,23	189,75	1,45	0,73	39,12
Bungarus Multicinctus	7,51	192,81	1,56	0,29	38,06
Trimeresurus Mucrosquamatus	4,32	198,06	1,25	0,93	34,31
Natrix Piscator	8,79	178,26	1,66	0,87	37,97
Natrix Annularis	9,67	194,51	1,13	0,39	38,92
Macropisthodon Rudis Carinatus	3,89	187,21	1,14	0,58	32,55
Enhydris Plumbea	5,26	195,15	0,97	0,82	39,61

Zur Isolierung der Fettsubstanzen wurde der Eiinhalt mit Alkohol und Äther erschöpfend extrahiert und aus verschiedenen Fraktionen die Phosphatide und Cholesterin durch Ausfällung und Extraktion getrennt. Zum Lecithinstoffwechsel einige Kennt-

TABELLE VI.

Arten der Schlangen	Gesamt-Fette (%)	Phosphatide (%)	Cholesterin (%)	Gesamt-Cholin (%)
Elaphe Taineurus	13,96	0,871	0,421	0,100
Elaphe Carinata	14,10	0,927	0,320	0,109
Ptyas Mucosus	14,30	1,018	0,427	0,122
Naja Naja Atra	11,53	0,001	1,812	0,105
Zaocys Nigromarginatus Oshimai	11,10	0,815	0,319	0,092
Ptyas Korros	14,06	0,725	0,337	0,078
Bungarus Multicinctus	12,73	1,022	0,310	0,123
Trimeresurus Mucrosquamatus	12,47	0,867	0,375	0,100
Natrix Piscator	12,75	1,164	0,389	0,134
Natrix Annularis	11,09	1,021	0,375	0,123
Macropisthodon Rudis Carinatus	13,82	0,005	0,473	0,114
Enhydris Plumbea	12,51	1,289	0,425	0,138

nisse beizutragen, habe ich daneben auf das Gesamtholin gearbeitet.

Die Resultate sind in Tabelle VI zusammengestellt.

Aus der Tabelle geht hervor, dass im Kobraei das Cholesterin im Vergleich zu anderen Schlangeneiern bedeutend reichlich vorhanden ist, während der Gehalt des Kobraeies an Phosphatide im Gegensatz dazu sehr klein ist.

TABELLE VII a.

Arten der Schlangen	Gesamt- asche (%)	K ₂ O (%)	Na ₂ O (%)	CaO (%)	MgO (%)
Elaphe Taineurus	3,7213	0,1621	0,1135	1,4268	0,0687
Elaphe Carinata	3,6581	0,1513	0,1102	1,1862	0,0694
Ptyas Mucosus	3,8023	0,1471	0,1172	1,1724	0,0702
Naja Naja Atra	3,7315	0,1283	0,1148	1,3848	0,0691
Zaocys Nigromarginatus Oshimai	3,8213	0,1493	0,1369	1,2196	0,0721
Ptyas Korros	3,7623	0,1328	0,1273	1,1892	0,0698
Bungarus Multicinctus	3,8015	0,1211	0,1073	1,1688	0,0672
Trimeresurus Mucrosquamatus	3,7127	0,1634	0,1095	1,1404	0,0658
Natrix Piscator	4,0213	0,1733	0,1227	1,3096	0,0924
Natrix Annularis	3,6083	0,1291	0,1187	1,2056	0,0623
Macropisthodon Rudis Carinatus	3,7512	0,1253	0,1241	1,2078	0,0752
Enhydris Plumbea	4,0027	0,1121	0,1084	1,1208	0,0881

TABELLE VII b.

Arten der Schlangen	P ₂ O ₅ (%)		SO ₃ (%)	Cl (%)	SiO ₂ (%)
	Anorg.	Org.			
Elaphe Taineurus	0,1013	1,3245	0,0257	0,0597	0,0042
Elaphe Carinata	0,1192	1,4660	0,0249	0,0565	0,0037
Ptyas Mucosus	0,0993	1,3728	0,0263	0,0621	0,0041
Naja Naja Atra	0,1327	1,6702	0,0485	0,0633	0,0036
Zaocys Nigromarginatus Oshimai	0,1235	1,2314	0,0392	0,0791	0,0029
Ptyas Korros	0,1261	1,5615	0,0376	0,0682	0,0027
Bungarus Multicinctus	0,1133	1,2035	0,0348	0,0595	0,0031
Trimeresurus Mucrosquamatus	0,0973	1,1963	0,0213	0,0774	0,0029
Natrix Piscator	0,1207	1,5924	0,0437	0,0647	0,0043
Natrix Annularis	0,0923	1,3134	0,0286	0,0612	0,0028
Macropisthodon Rudis Carinatus	0,1054	1,3084	0,0392	0,0556	0,0032
Enhydris Plumbea	0,0986	1,3752	0,0451	0,0562	0,0033

5. *Anorganische Bestandteile des Schlangeneies.* Im Anschluss an die bereits angegebenen Beobachtungen (1930–1936) bei Vogel-, Reptilien-, Amphibien-, Gastropoden- und Cephalopodeneiern habe ich den Versuch unternommen, die anorganischen Bestandteile des Schlangeneies zu ermitteln.

Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Mineralbestandteile lässt sich aus Tabelle VII ersehen.

Aus der Tabelle ersieht man, dass der grösste Teil der Aschen aus Kalkphosphat und zwar aus organischen Phosphaten besteht. Unter den einzelnen Schlangenarten bemerkt man keine grosse Verschiedenheit.

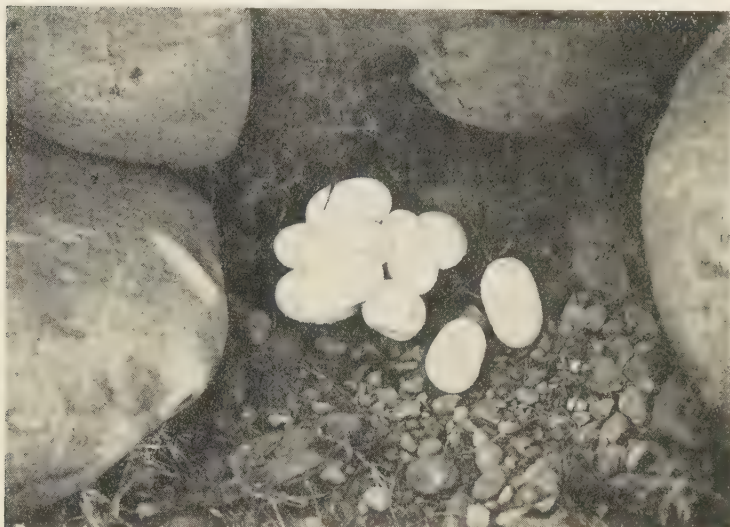
III

Man muss erwarten, dass die im Eiinhalt während der Ei-entwicklung nachweislichen chemischen Prozesse auf eine Überführung der vorhandenen Vorratsstoffe des Eiinhaltes in die in der Bildung begriffenen Gewebe und Organe des Keimlings hinauslaufen. Man bestimmt sie also grundsätzlich durch successive Analyse des Eiinhaltes auf die in Frage kommenden Substanzen im Laufe der Eientwicklung.

Bei eilegenden Schlangenarten müssen der Entwicklungsgrad und die chemischen Vorgänge bei verschiedenen Entwicklungsstufen nur durch künstliche Bebrütung festgestellt werden. Nach langwierigen Bemühungen und wiederholten Misserfolgen gelang es mir, die frisch gelegten Eier von *Elaphe Taineurus* (Abb. 2.) unter sorgfältiger Pflege 76 Tage lang zu bebrüten. Nach dieser Bebrütungsdauer schlüpften die Jungen aus, die durchschnittlich 44 cm Länge und 23 g Gewicht haben.

Bei den Versuchen mit lebendgebärenden Schlangeneiern können die im Mutterleibe sich entwickelnden Eier Gegenstand einer exakten Untersuchung werden. Um die physikalischen Existenzbedingungen der Organismen einigermaßen zu erschliessen, und um gewisse Anhaltspunkte über die Aufspaltung, Überführung und Umwandlung der organischen und anorganischen Substanzen der Eibestandteile zu erhalten, wurden die pH-Werte des Eiinhaltes bestimmt. Sie schwanken in einer er-

Abbildung 2.

Frisch gelegte Eier von *Elaphe Tainurus*.

lässlichen Begrenzung. Wie aus Tabelle VIII ersichtlich, ist die Reaktion bei den mittleren Entwicklungsstufen schwach sauer und reagiert gegen Ende der Eientwicklung immer alkalisch.

TABELLE VIII.

Arten der Schlangen	Gewicht des Eies im Mutterleibe (g)	pH-Wert	Bemerkungen über die Entwicklung
<i>Elaphe Tainurus</i>	3,2	7,2	Anfang der Entwicklung
	7,1	7,3	
	9,8	6,7	
	12,5	6,6	
	16,3	6,7	
	17,2	6,8	
	25,3	7,3	
	27,0	8,0	Ende der Entwicklung
	29,0	8,4	

Elaphe Carinata	3,0	7,3	Anfang der Entwicklung
	4,3	7,4	
	6,1	6,8	
	10,2	6,9	
	12,0	6,7	
	15,0	6,6	
	16,9	6,5	
	21,3	7,0	
	23,0	7,4	
	26,0	8,6	Ende der Entwicklung
Ptyas Mucosus	2,7	7,2	Anfang der Entwicklung
	5,1	7,1	
	8,0	7,0	
	11,0	7,0	
	14,3	6,7	
	17,0	6,6	
	20,0	7,6	
	22,0	8,5	Ende der Entwicklung

LITERATUR.

- Bywaters, H. W. (1913): Biochem. Zs. **55**, 245.
 Idzumi, S. (1924): Mittsil. v. d. med. Fakult. Univ. Tokyo **32**, 197.
 Iseki, T. (1930): H-S **188**, 189.
 Iseki, T. u. Kumon, T. (1933): Jl. Biochem. **17**, 109.
 Kamachi, T. (1936): H-S **238**, 91.
 Karashima, J. (1933): Jl. Biochem. **10**, 369.
 Kataoka, E. (1931): H-S **203**, 272.
 Kataoka, E. u. Tsunoo, S. (1933): Jl. Biochem. **17**, 417.
 Kumon, T. (1933): Jl. Biochem. **18**, 145.
 Murray, H. A. (1926); Jl. Gesamt. Physiol. **9**, 405.
 Sagara, J. (1930): Jl. Biochem. **11**, 433.
 Sato, G. (1916): Act. Schol. Med. Univ. Kyoto **1**, 375.
 Takamatsu, M. (1935): Jl. Biochem. **22**, 203.
 Tomita, M. (1928): Jl. Biochem. **10**, 355.

ÜBER DIE CHEMISCHEN BESTANDTEILE DES SCHNECKENEIES.

VON

SHINOBU FUKUDA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 6. Februar 1939)

Wenn unsere Kenntnisse hinsichtlich der chemischen Beschaffenheit der Eier wirbelloser Tiere in gar keinem Verhältnisse zu dem Interesse stehen, das die morphologisch arbeitenden Naturforscher seit einem Jahrhunderte diesen Gebilden entgegengebracht haben, so lässt sich dafür nicht einmal die Entschuldigung geltend machen, dass das Untersuchungsmaterial in der erforderlichen Mengen allzu schwer zu beschaffen wäre.

Um Eier der Cephalopoden zur embryochemischen Untersuchung reichlich zu beschaffen und zur reifen Entwicklung zu veranlassen, hat Kamachi (1935) über 1000 befruchtete Weibchen des japanischen Lanzenkalmers lebend gefangen, in Wasserstuben gesetzt und auf die darin schwimmenden Holzplatten die Eier ablegen lassen.

Was die chemischen Bestandteile der marinen Gastropodeneier betrifft, hat Y. Komori (1926) zunächst die Mukoids substanz in der Eisackflüssigkeit des *Hemifusus tuba* Gmel. gefunden und weiter die chemische Zusammensetzung des Vitellins dieses Tieres untersucht. Es sei hier daran erinnert, dass die im marinen Gastropodenei vorhandenen Reststickstoffformen und Kalksalze nach Kumon (1933) sich während der Eientwicklung stetig vermehren und dass diese Vermehrung auf der Stoffzufuhr aus Seewasser beruht.

Um eine Mobilisierung einzelner Eibestandteile und ihre Überführung in den Embryo während der Bebrütung zu ersehen, muss man die organischen und anorganischen Stoffe in ganz verschiedenen Entwicklungsstadien des jungen Tieres möglichst

systematisch verfolgen. Dazu geeignet sind die Eier der Schnecke, welche ausserhalb des mütterlichen Organismus sich entwickeln und alle Elemente des jungen Tieres enthalten, so dass sie keine Stoffzufuhr von aussen brauchen.

Eine Landschnecke, *Achatina fulica* Férussac genannt, wurde vor mehreren Jahren aus tropischen Gegenden hierher in Formosa eingeführt, indem sie dem Menschen einen bestimmten Nutzen leistet, und zwar dadurch, dass sie ihm in ihren Weichteilen eine in vielen Ländern überaus geschätzte Nahrung darbietet. Heutzutage ist ihr Verbrauch hier ein viel geringerer, weil sie schädlich erscheint, insofern sie mit besonderer Vorliebe Kulturpflanzen nachstellt. Der Gärtner wird sie daher stets vernichten.

Zur Entwicklung werden die Eier abgelegt. Die Schnecke bringt die Eier sehr sorgsam unter. Sie gräbt eine Höhlung in die Erde, ein engerer, trichterförmiger Zugang führt hinein; durch diesen streckt die Schnecke den Vorderleib und lässt Ei auf Ei hinabfallen. Dann wird die Öffnung geschlossen.

1. *Die Grösse und das Gewicht des Eies.* Die Eier sind rundlich oval. Die Länge des Eies beträgt 5mm, die Dicke desselben 3mm. Die Schale bildet mehr oder weniger eine pergamentartig derbe Umhüllung des eigentlichen Eies. Das Gewicht der gereinigten Schale beträgt ungefähr 16,5% des Gesamtgewichtes vom unbebrüteten Ei. Was das Gewicht der Eier betrifft, so zeigt es keine grosse Schwankungen. Bei meinen Untersuchungen habe ich als Mittelwert für 47100 Eier 47,7mg gefunden. Das Verhältnis von Schale und Eiinhalt wird kurz in folgender Tabelle zusammengestellt.

TABELLE I.

	Gewicht von 47100 Eiern	Mittelwert des Gewichts von 1 Ei	
ganzes Ei	2247,5 g	47,7 mg	100,0%
Schale	370,5 g	7,87 mg	16,5%
Eiinhalt	1877,5 g	39,83 mg	83,5%

2. *Nährstoffverteilung im Schneckenei.* Um die chemischen

Zusammensetzungen des Einhaltes zu erkennen, habe ich den Gesamteinhalt der 47100 Eier (= 1877,5 g) auf dem Wasserbade verdampft, mit Alkohol und dann mit Äther extrahiert. Der Alkohol-Äther-Extrakt enthält Fette, Cholesterin, Phosphatide und Milchsäure. In dem in Alkohol-Äther unlöslichen Rückstand können wir Eiweissstoffe, Zucker, Kreatin, Kreatinin und Salze finden. In 47100 Eiern verteilen sich die Nährstoffe wie folgt.

TABELLE II

47100 Eier (= 1877,5 g Inhalt)	Wasser	Fettstoffe			Fettfreie Trockensubst.	
		Fette	Phosphatide	Cholesterin	Eiweissstoffe	Eiweissfreie Trockensubst.
g	1468,50	2,10	0,48	0,17	191,80	214,45
%	78,21	0,11	0,02	0,00	10,21	11,44

Unter den stickstofffreien Extraktstoffen wurden freie und gebundene Zuckerart gefunden, deren Menge 0,07% und 0,06% war. *d*-Milchsäure wurde als Li-Salz polarimetrisch ermittelt. Sie ist nur 0,007% vorhanden. Kreatin und Kreatinin sind nur kolorimetrisch bestimmbar. Wasserunlösliche Substanz beträgt 1,08%.

3. *Anorganische Bestandteile.* In der Asche wurden Phosphorsäure, Schwefelsäure, Chlor, Natrium, Kalium, Calcium-Magnesium und Kieselsäure konstatiert. Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Mineralbestandteile ist der Übersichtlichkeit in halber Tabelle III zusammengestellt.

TABELLE III

Mineralbestandteile im ganzen Einhalt %							
K ₂ O	Na ₂ O	CaO	MgO	P ₂ O ₅	SO ₃	Cl	SiO ₂
0,0374	0,0181	1,2946	0,0225	0,2515	0,0295	0,0556	0,3825

Aus der Tabelle ersieht man, dass der grösste Teil der Asche aus Kalksalzen besteht, wahrscheinlich aus Ca-Phosphat.

Es ergab sich weiter als wesentlicher Befund, dass der Gehalt an Silikat im Vergleich zu den Eiern von anderen Tierarten bedeutend hoch ist.

4. *Gesamt- und Reststickstoff.* Bei der Ermittlung des Gesamt- und Reststickstoffes stellt sich heraus, dass die Gesamtstickstoff- und Reststickstoffmenge des Schneckeneies im Vergleich zu marinen Gastropodeneiern viel grösser ist und sie ist fast gleich gross wie die der Meerschildkröteneier. Die nachfolgende Tabelle IV zeigt die Ergebnisse.

TABELLE IV

Gesamt-N (%)	Rest-N (%)	Rest-N durch PWS fällbaren Natur (%)	Amino-N nach van Slyke (%)
1,6351	0,0198	0,0085	0,0052
1,6111	0,0190	0,0079	0,0046
1,6231	0,0194	0,0082	0,0049

5. *Über Fermente im Schneckenei.* Was nun die Fermente im Ei betrifft, so haben viele Forscher das Hühnerei zum Studium gewählt. Herlitzka (1907), Takahashi (1935) und Takamatsu (1935) haben die Fermentwirkung im Amphibienei untersucht. Andererseits hat Sagara (1929) im Reptilienei und Kamachi (1936) im Cephalopodenei ähnliche Untersuchungen ausgeführt. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Quantitäten der Fermente und ihre Lokalisation bei verschiedenen Tierarten sich sehr ähnlich verhalten.

Um das Verhalten der Fermentwirkung bei Vogel-, Reptilien-, Amphibien-, Cephalopoden- und Gastropodeneiern miteinander zu vergleichen, habe ich das Studium der Fermente im Schneckenei aufgenommen. Unter den Fermenten untersuchte ich auf Amylase, Esterase, Nuklease, Arginase, Phosphatase und proteolytische Fermente. Im frischen Ei sind die Wirkungen der Amylase, Esterase und Nuklease sehr stark. Ausserdem sind Arginase, Phosphatase und Trypsin nachweisbar. Die stärkeren Fermentwirkungen im frischen Schneckenei deuten darauf hin,

dass die Bebrütungsdauer des Schneckeneies sehr kurz ist und sich dadurch die chemischen Umwandlungen der einzelnen Eibestandteile schon von Anfang der Entwicklung an lebhaft vollziehen.

LITERATUR.

- Herlitzka (1907): zitiert in Needhams Chemical Embryology, S. 1302.
Kamachi, T. (1935): H-S. **238**, 91.
Komori, (1926): JI. of Biochem. **6**, 129.
Kumon, T. (1933): JI. of Biochem. **18**, 145.
Sagara, J. (1929): JI. Biochem. **10**, 379.
Takahashi, I. (1935): JI. of Biochem. **22**, 45.
Takamatsu, M. (1935): JI. of Biochem. **22**, 203.

ÜBER DIE N-HALTIGEN EXTRAKTIVSTOFFE, BESONDERS DIE ORGANISCHEN BASEN DER BAUCHSPEICHELDRÜSE.

VON

SHINOBU FUKUDA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu
Taihoku. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 6. Februar 1939)

Bei der grossen Rolle, welche der Bauchspeicheldrüse im Haushalt des Körpers zufällt, und bei den komplizierten chemischen Prozessen, die sich in ihr abspielen, sollte man annehmen, dass die N-haltigen Extraktivstoffe dieses Organes in allererster Linie das Interesse der Physiologen auf sich gelenkt hätten. Bekanntlich besitzt das Pankreas einerseits eine exkretorische und andererseits eine inkretorische Funktion.

In der Hoffnung, dass man durch genaue chemische Untersuchung des Pankreas-Extraktes vielleicht dahin gelangen könne, die Muttersubstanzen des Inkretstoffes und der Pankreasfermente etwas weiter aufzuklären, habe ich im Anschluss an bereits mitgeteilte Beobachtungen den Versuch unternommen, N-haltige Extraktivstoffe besonders die organischen Basen der Bauchspeicheldrüse möglichst systematisch und quantitativ zu verfolgen.

Zur Beschaffung des erforderlichen Materials ist das Schweinepankreas geeignet, da im hiesigen Schlachthofe über zweihundert Schweine täglich getötet werden. Möglichst frische Schweinepankreas wurde fein zerkleinert und mit Alkohol übergossen. Der Niederschlag wurde unter Äther von den anhaftenden Spuren von Fett befreit und dann mit warmem Wasser extrahiert. Aus säuerlichen vereinigten Extrakten wurde das Protein in der Hitze koaguliert. Das Filtrat wurde dann durch Tannin-Blei-Methode vollständig enteiwisst. Nach dem Einengen des eiweissfreien Filtrates hat man das krystallinisch ausgeschiedene Tyrosin und Leucin beseitigt. Das eingeeengte Filtrat wurde in

schwefelsaurer Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt.

I. FÄLLUNG DURCH PHOSPHORWOLFRAMSÄURE.

Dargestellt wurden auf diese Weise reichliche Mengen von Phosphorwolframsäure-Fällung; dazu waren 24,42 kg Schweinepankreas erforderlich. Aus dieser Fällung wurden organische Basen entweder als Pikrat oder als Pikrolonat rein krystallinisch erhalten.

Das Phosphorwolframat wurde in üblicher Weise mit Baryt zersetzt und dann mit Kohlensäure ausgefällt. Die eingeeengten Lösungen reagierten stark alkalisch. Wird die Abwesenheit des Bariums in der Lösung mit Schwefelsäure geprüft, setzt man eine konzentrierte Pikrinsäurelösung bis zur neutralen Reaktion hinzu und lässt die Lösung im Eisschrank stehen. Nach einigen Tagen schieden sich schöne Krystalle aus, die scharf bei 250° schmelzen.

3,357 mg Substanz gaben 4,550 mg CO₂ und 0,975 mg H₂O.

3,102 mg " " 0,529 cc N₂ (765 mm, 18°).

0,2903 g " " 0,2400 g Pikrinsäure

C₁₀H₂₆N₄4(C₆H₃N₃O₇)

Ber.	C 36,49%	H 3,39%	N 20,03%	Pikrinsäure 81,93%
------	----------	---------	----------	--------------------

Gef.	" 36,96 "	" 3,25 "	" 20,12 "	" 82,67 "
------	-----------	----------	-----------	-----------

Wenn das Pikrat mit Schwefelsäure angesäuert, die Pikrinsäure mit Äther extrahiert, die Schwefelsäure mit Baryt entfernt und die regenerierte Lösung mit Pikrolonsäure versetzt wurde, so schied sich ein Pikrolonat aus, das bei 280° schmilzt.

Man hat andererseits die Verbindung als Phosphat krystallinisch erhalten, welche bei 235° schmilzt.

Es unterliegt keinem Zweifel, dass die hier erhaltene Substanz mit dem Spermin von Dudley (1924) und Wrede (1927) identisch war.

Die Mutterlauge des Sperminpikrates wurde nach dem Einengen im Eisschrank mehrere Tage lang stehen gelassen. Dabei schied sich eine hübsch krystallisierte Masse aus, die nach Umkrystallisieren scharf bei 208° schmilzt. Die Analysen ergaben folgende Werte:

3,980mg Substanz gaben 5,240mg CO₂ und 1,280mg H₂O.

3,170 " " 4,186 " 0,970 "

3,010 " " 0,516ccm N₂ (18°, 765mm).

3,250 " " 0,557 " N₂ (18°, 765mm).

0,5947g " " 0,4943g Pikrinsäure.

C₇H₁₉N₃3(C₆H₃N₃O₇)

Ber. C 36,06% H 3,36% N 20,19% Pikrinsäure 82,57%

Gef. " 35,93 " " 3,57 " " 20,25 " " 83,12 "

" 36,01 " " 3,41 " " 20,24 "

Die Substanz erwies sich also als Spermidin pikrat.

Der Sirup, der durch Eindampfen der Filtrate von Spermidin pikrat erhalten wurde, krystallisierte nicht mehr. Durch Lösen in schwefelsaurem Wasser und Extraktion mit Äther wurde die Pikrinsäure befreit. Nach dem Einengen werden die schwer krystallisierbaren Basen wieder als Phosphorwolframat ausgefällt.

Die Phosphorwolframsäurefällung wurde nach der Regenerierung in bekannter Weise wieder mit Pikrinsäure gefällt. Der Explosionspunkt der gereinigten Krystalle lag bei 258°. Die Analyse ergab;

3,915mg Substanz gaben 5,565mg CO₂ und 1,550mg H₂O.

4,185 " " 5,952 " 1,650 "

3,012 " " 0,475ccm N₂ (18°, 765mm).

0,8748g " " 0,5381g Pikrinsäure.

C₆H₁₄N₂O₂C₆H₃N₃O₇

Ber. C 38,40% H 4,53% N 18,67% Pikrinsäure 61,06%

Gef. " 38,77 " " 4,43 " " 18,61 " " 61,51 "

" 38,61 " " 4,41 "

Damit ist das Vorkommen von Lysin in Pankreasextrakt festgestellt.

Wenn man die Mutterlauge von Lysin pikrat noch weiter einengt und in Eisschrank stehen lässt, so beginnt allmählich eine Krystallisation von Arginin pikrat.

3,500mg krystallwasserfreie Substanz gaben 4,615mg CO₂ und 1,320mg H₂O.

3,697 " " " 4,840 " 1,360 "

4,125 " " " 0,848ccm N₂ (18°, 765mm).

C₆H₁₄O₂N₄C₆H₃N₃O₇

Ber. C 35,71% H 4,21% N 24,31%

Gef. " 35,96 " " 4,22 " " 24,29 "

" 35,70 " " 4,12 "

Die Argininfraktion schien ausser dem Arginin noch ein andere Base zu enthalten. Die Mutterlauge des Argininpikrates gibt nach Tagen feinnadelige Krystallisationen, die schon dem Aussehen nach sich von Lysin und Arginin deutlich unterscheiden. Diese Krystalle zeigten den Schmelzpunkt 221° .

3,980 mg Substanz gaben 5,370 mg CO_2 und 1,250 mg H_2O .

3,495 " " 0,598 ccm N_2 (20° , 760 mm).

$\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_7$)

Ber. C 36,43% H 3,71% N 20,00%

Gef. " 36,80 " " 3,51 " " 19,93 "

Die Base ist daher wahrscheinlich Cadaverin.

Wenn man die Mutterlauge des Cadaverinpikrates ausgeäthert, die Schwefelsäure mit Baryt entfernt und die regenerierte Basenlösung mit Pikrolonsäure versetzt, so schied sich Histidin-pikrolonat als schöne Krystalle aus, die sich bei 232° zersetzen.

3,380 mg Substanz gaben 5,664 mg CO_2 und 1,268 mg H_2O .

3,142 " " 0,622 ccm N_2 (19° , 763 mm)

$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_5$

Ber. C 45,82% H 4,06% N 23,39%

Gef. " 45,70 " " 4,17 " " 23,24 "

II. FILTRAT DER PHOSPHORWOLFRAMSÄURE-FÄLLUNG.

Während aus der Phosphorwolframsäurefällung die oben erwähnten Basen isoliert wurden, wurden aus dem Filtrat Inosit, Asparaginsäure, Bernsteinsäure, Uracil und Alanin erhalten.

Inosit wurde als Hexabenzoylinosit rein krystallinisch getrennt. Die Bernsteinsäure hat man durch Ausäthern dargestellt. Wenn man die letzte Mutterlauge mit Silberoxyd behandelt, so fällt das Uracil vollständig aus und nach dem Zerlegen des Silbers mit Schwefelwasserstoff scheidet es als freie Substanz krystallinisch aus.

Das Filtrat der Silberfällung wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die von Schwefelsilber abfiltrierte Lösung eingeeengt und mit absolutem Alkohol extrahiert. Der Alkoholextrakt wurde nach dem Verdunsten des Alkohols in wenig Wasser gelöst und in üblicher Weise benzoyliert. Wird die ölig ausgeschiedene

Benzoylverbindung zerlegt, so bekommt man daraus Alanin in Krystalform.

Analyse:

Hexabenzoylinosit

3,256mg Substanz gaben 8,516mg CO₂ und 1,316mg H₂O.

C₆H₆O₆(C₇H₅O) Ber. C 71,63% H 4,51%

Gef. " 71,33 " " 4,49 "

Bernsteinsäure

4,060mg Substanz gaben 6,050mg CO₂ und 1,845mg H₂O.

3,780 " " 5,600 " 1,715 "

C₄H₆O₄ Ber. C 40,68% H 5,08%

" 40,64 " " 5,08 "

" 40,40 " " 5,08 "

Uracil

3,585mg Substanz gaben 5,640mg CO₂ und 1,205mg H₂O.

2,555 " " 0,519ccm N₂ (10°, 770mm).

C₄H₄O₂N₂ Ber. C 42,86% H 3,57% N 25,00%

Gef. " 42,91 " " 3,76 " " 24,83 "

Alanin

3,600mg Substanz gaben 5,320mg CO₂ und 2,500mg H₂O.

4,105 " " 6,110 " 2,780 "

3,580 " " 0,490ccm N₂ (30°, 760mm).

3,155 " " 0,431ccm N₂ (30,5°, 762mm).

C₃H₇O₂N Ber. C 40,43% H 7,92% N 15,72%

Gef. " 40,30 " " 7,77 " " 15,42 "

" 40,59 " " 7,58 " " 15,40 "

Die Gesamtmenge der aus Schweinepankreas isolierten Extraktivstoffe ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

TABELLE I

Schweinepankreas

Alkohol-Äther-Extrakt 86,486%

Trockensubstanz 13,514

in Wasser unlöslich 1,654

Wasserextrakt 11,854

Tyrosin 0,160

Leucin..... 1,084

Spermin 0,002

Spermidin 0,014

Lysin 0,232

Arginin 0,166

Cadaverin	0,005
Histidin	Spur
Inosit	0,062
Asparaginsäure	Spur
Bernsteinsäure	0,006
Uracil	0,005
Alanin	0,012

LITERATUR.

- Dudley, H. W., Rosenheim, M. C. u. Rosenheim, O. (1924): Biochem. J. **18**, 1263.
Dudley, H. W., Rosenheim, O. u. Starling, W. W. (1927): Biochem. J. **21**, 97.
Wrede, F. u. Banik, E. (1923): H-S **131**, 38.
Wrede, F. Fanselow, H. u. Strack, E. (1927): H-S **163**, 219.

ÜBER DAS KEPHALIN BEI DER BLUT- GERINNUNG.

VON

HIDETANE MICHIMOTO.

(Aus den Mediz.-Chemischen Institut der Keio-Universität, Tokyo.

Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 10. Februar 1939)

EINLEITUNG.

Neuerdings hat Kurosawa (1938) aus unserem Institut nachgewiesen, dass die Blutgerinnung aktivierende Substanz im Gewebe ein Kephalin-Eiweiss-Komplex ist und dass Kephalin relativ leicht in Alkohol löslich ist.

Es ist allgemein bekannt, dass die ungesättigte Fettsäure im allgemeinen viel leichter in Alkohol löslich ist als die gesättigte, was zwar bei den hochungesättigten im höheren Masse der Fall ist.

Koyama (1937) hat bei den von ihm hergestellten Cadmiumverbindungen des Eierphosphatides die Verhältnisse ihrer Alkohol-löslichkeit geprüft und festgestellt, dass die letztere bei den hochungesättigten Fettsäuren viel auffälliger ist.

Aus obigen Tatsachen entsteht die Annahme, dass Kephalin, welches relativ leicht in Alkohol löslich ist, aus der hochungesättigten Fettsäure besteht.

Levene (1925) hat von der Ätherlösung der Lecithine die unlösliche Bromverbindung isoliert und konnte feststellen, dass sie Hexabromlecithin ist. Ich habe auch in der vorliegenden Untersuchung versucht das die Blutgerinnung aktivierende Kephalin, welches wahrscheinlich aus der hochungesättigten Fettsäure besteht, unter der Bildung seiner Bromverbindung zu trennen.

VERSUCHUNGSMETHODE UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL.

Die im Verlauf der Arbeit durchgeführten Gerinnungsver-

suche wurden in Reagensgläsern ausgeführt, die in einem Wasserthermostaten (38°) standen, und dabei wurde aus Kaninchenblut dargestelltes Oxalatplasma verwendet. Das Kephalin wird nach gewöhnlicher Weise bromiert und dann mit Zinkpulver und Salzsäure-Alkohol entbromiert. Das entbromierte Kephalin weist im Vergleich mit dem nicht bromierten eine schwächere Blutgerinnung aktivierende Wirkung auf, doch ist es für Experimente brauchbar.

Das für die Untersuchung benutzte Eiweiss sind die bei der Extrahierung der Rinderlunge mit Benzol gewonnenen Reste.

Versuch I.

In erster Linie habe ich die Bromverbindung des Kephalins aus Rinderherz hergestellt und dann folgende Versuche vorgenommen, um die Löslichkeit dieser Bromverbindung in Solventen, wie Äther, Petroläther, Benzol u.a., zu prüfen.

A. Der Abdampfrest des Alkohol-Äther-Extraktes des Rinderherzens wurde in Äther gelöst und über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Nach dem Entfernen der dabei ausgefallenen Niederschläge wurde die Lösung wieder abgedampft. Der Abdampfrest wurde in Aceton gelöst, die ungelöste Substanz bei 40° in absolutem Alkohol aufgelöst und darauf bis auf 0° abgekühlt. Die dabei ausgefallene Substanz ist Kephalin; sie weist eine starke Blutgerinnung aktivierende Wirkung auf. Dieses Ergebnis stimmt also mit dem von Kurosawa (1938) gut überein. Der ätherischen Lösung dieser ungelösten Substanz wurde Brom zugesetzt, um die unlösliche Bromverbindung zu trennen. Die letztere wurde dann weiter nach der oben erwähnten Methode entbromiert.

Mit der auf diese Weise hergestellten Substanz und dem Eiweiss wurde die Blutgerinnung aktivierende Wirkung geprüft; diese Resultate sind in Tabelle 1 angegeben.

TABELLE I.

Mischung	Gerinn. Z.
0,5 ccm Plasma + 0,25 cc Kephalin-Eiw. + 0,1 cc CaCl ₂	2'30"
0,5 ccm Plasma + 0,25 cc NaCl-Lös. + 0,1 cc CaCl ₂	8'00

B. Die beim eben erwähnten Experiment A gewonnene ätherlösliche Bromverbindung wurde ebenso entbromiert. Nach der Entbromierung wurde die Blutgerinnung aktivierende Wirkung in gleicher Weise wie beim obigen Experiment geprüft, doch fiel die Prüfung negativ aus.

C. Der beim Experiment A gewonnenen ätherunlöslichen Bromverbindung wurde Petroläther zugefügt, die lösliche und unlösliche Portion wurden abgetrennt, an deren jeder die Entbromierung angestellt wurde. Nach der Entbromierung wurde die Blutgerinnung aktivierende Wirkung mit jeder Portion und dem Eiweiss geprüft. Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, ergab sich, dass die unlösliche Portion deutlich positive Resultate lieferte, während die lösliche kaum positive zeigt.

TABELLE II.

Mischung	Gerinn. Z.
0,5 ccm Plasma + 0,25 cc Kephalin-Eiw. + 0,1 cc CaCl_2	2' 20"
0,5 ccm Plasma + 0,25 cc NaCl-Lös. + 0,1 cc CaCl_2	10' 00

D. Der beim Versuch C zustande kommenden, in Petroläther unlöslichen Bromverbindung wurde Benzol zugesetzt und die unlösliche Portion wurde abgetrennt. Nach der Entbromierung wurde die Blutgerinnung aktivierende Wirkung mittels der beiden Teile und des Eiweisses geprüft. Daraus geht hervor, dass der lösliche Teil nahezu keine aktivierende Wirkung zeigte, während der unlösliche diese deutlich darbot, wie aus der Tabelle III ersichtlich ist.

TABELLE III.

Mischung	Gerinn. Z.
0,5 ccm Plasma + 0,25 cc Kephalin-Eiw. + 0,1 cc CaCl_2	3' 0"
0,5 ccm Plasma + 0,25 cc NaCl-Lös. + 0,1 cc CaCl_2	10' 0"

E. Bei der beim Versuch D gewonnenen, benzolunlöslichen Bromverbindung wurden Stickstoff und Phosphor quantitativ gemessen, deren Mengenverhältnis im folgenden angegeben ist.

Der Stickstoff wurde mit dem Azotometer nach Iwasaki, Ohtsuki und Nakajima (1937) und das Phosphor mit der Naito'sche Methode (1928) gemessen.

N, 37,3 mg :
P, 71.5 mg :: 1 : 1.

Dann wurde der gesammte Stickstoff und Amino-N nach Nakajima'schr Methode (1932) quantitativ gemessen; das Mengenverhältnis war wie folgt:

Gesamt-N, 1,54 mg : Amino-N, 1,43 mg :: 10 : 9,3.

Aus obigen Resultaten geht hervor, dass die an der Blutgerinnung aktivierenden Wirkung sich beteiligende Bromverbindung des Kephaling in Äther, Petroläther und Benzol unlöslich ist. Daraus erkennt man, dass das betreffende Kephalin aus der hochungesättigten Fettsäure besteht.

Versuch II.

A. 300g Rinderleber wurde in kleine Stückchen zerschnitten und mit 20facher Menge von Alkohol-Äther (3 : 1) etwa 10 Minuten lang gekocht, dann filtriert. Das Filtrat wurde in Vakuum abgedampft, der Abdampfrest wurde in 10facher Menge absolutem Alkohol (40°) gelöst; dieser Alkoholextrakt wurde nochmals in Vakuum abgedampft und der Abdampfrest wurde in 5facher Menge von Absolutalkohol (40°) aufgelöst. Der so hergestellte Alkoholextrakt wurde abermals im Vakuum abgedampft.

Der Abdampfrest wurde in 100 ccm Absolutalkohol (40°) aufgelöst. Dieser Alkoholextrakt wurde dann in 30 ccm Portionen eingeteilt; jede Portion wurde je bis auf 0°, -10° und -20° 3 Stunden lang abgekühlt. Die dabei erfolgten Niederschläge wurden mit dem abgekühlten Filter filtriert. Bei dem Filtrat wurden der gesamte Stickstoff und Amino-Stickstoff gemessen. Andererseits wurden beide auch bei der ätherischen Lösung der Niederschläge gemessen. Die Resultate sind in Tabelle IV angegeben.

Nach der Tabelle IV fällt der Amino-Stickstoff zum grössten Teil aus, falls die Lösung, welche bei 40° mittels Alkohol hergestellt wurde, bis auf -10° abgekühlt wird. Also enthält das Filtrat schon sehr wenig Kephalin; trotzdem tritt die Blutgerinnung aktivierende Wirkung dabei klar auf. Diese Ergeb-

TABELLE IV.

Temperat.	Material	Gesamt-N (mg/dl)		Amino-N (mg/dl)		Gerinn. Zeit.
		Nr. 1.	Nr. 2.	Nr. 1.	Nr. 2.	
0°	Alkoh.-Lös.	65.	68.	60.	55.	3' 30"
	Äther.-Lös.	28.	27.	24.	20.	2' 00"
-10°	Alkoh.-Lös.	60.	65.	5.	5.	5' 50"
	Äther.-Lös.	37.	33.	37.	30.	50"
-20°	Alkoh.-Lös.	41.	52.	3.	3.	5' 00"
	Äther.-Lös.	54.	48.	48.	48.	1' 20"
Kontrolle	—	—	—	—	—	7' 00"

nisse scheinen höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen sein, dass das Kephalin in kleinster Menge noch in der Lösung zurückbleibt und die Blutgerinnung aktivierende Wirkung darstellt. Dass für die Aktivierung der Blutgerinnung die kleinste Menge von Kephalin genügend wirksam ist, wurde ebenso bei der Untersuchung von Kurosawa (1938) bemerkt.

Wenn man die obigen Resultate zusammenfassend übersieht, so versteht man, dass das Kephalin bei der Abkühlung der alkoholischen Lösung (bei 40°) bis auf -10° zum grössten Teil ausfällt. Somit wird das Kephalin, welches aus der die Blutgerinnung aktivierbaren, hochungesättigten Fettsäure besteht, gewonnen, indem man den dabei ausfallende Niederschlag bromiert und aus der Bromverbindung die äther-, petroläther- und benzol-unlösliche Substanz abtrennt. Weil das Lecithin und Fett, welche beide ebenso aus den hochungesättigten Fettsäuren bestehen, relativ leicht in Alkohol löslich sind und das erstere (Eierlecithin) bei 2% Lösung und das letztere (Leinöl) bei 0,3% Lösung erst den Niederschlag bilden, so kann man die Bromverbindung des Kephalsins gewinnen, falls man die Lösung von niederer Konzentration als der eben angegebenen benutzt und nach oben erwähntem Verfahren behandelt.

Versuch III.

Auf Grund der obigen Ergebnisse habe ich das die Blut-

gerinnung aktivierende hochungesättigte Kephalin, welches im Gewebe des Kaninchens enthalten ist, mit den folgenden Verfahren, die Bromverbindung desselben herstellend, isoliert und quantitativ gemessen:

Dem mittels Schmirgels zermahlenen 2 g Gewebe fügt man 200 ccm Alkohol-Äther (3:1) zu und kocht einige Minuten lang, um das Gewebe zu extrahieren. Nach dem Filtrieren wird das Filtrat in Vakuum abgedampft; der Abdampfrestd wird in 100 ccm Absolutalkohol (bei 40°) gelöst und das Filtrat lässt sich wieder in Vakuum abdampfen. Der Abdampfrestd wird in 50 ccm Absolutalkohol bei 40° aufgelöst; das Filtrat wird bei -10° etwa 2 Stunden lang abgekühlt und unter Abkühlung filtriert. Der Niederschlag lässt sich in 50 ccm Äther auflösen, indem man dabei das Brom binden lässt; darauf wird der Äther abgedampft und 50 ccm Benzol zugefügt. Die benzolunlösliche Bromverbindung wird mittels des Asbestfilters angesammelt und gewogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle V angegeben.

TABELLE V.

Gewebe	Bromverbind. (Mg %)
Gefäss	591,7
Herz	111,6
Lunge	33,3
Leber	31,6
Niere	30,0
Muskel	13,3

Nach Tabelle V enthält das Gefäss das die Blutgerinnung aktivierende Kephalin am reichlichsten, dann folgt das Herz und am geringsten enthält es der Skelettmuskel. Der Gehalt ist zwar beim Herzen etwa 8fach grösser als beim Skelettmuskel und beim Gefäss sogar etwa 48fach grösser als beim letzteren.

Der solche gross Gehalt beim Gefäss und Herzen ist wahrscheinlich dafür bedeutsam, dass bei der Blutung an solchen Geweben infolge irgendeines Angriffs die Blutung durch schnelle Gerinnung des Blutes leicht verhindert werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS.

1. Das die Blutgerinnung aktivierende Substanz im Gewebe zusammensetzende Kephalin wurde als Bromverbindung isoliert, deren Blutgerinnung aktivierende Wirkung nach der Entbromierung geprüft wurde. Dabei wurde festgestellt, dass bei Kephalin, dessen Bromverbindung in Äther, Petroläther und Benzol unlöslich ist, die betreffende Wirkung sich intensiv entfaltet.

2. Kühlt man die Alkohollösung (40°) des Extraktes von Fettstoff im Gewebe bis auf -10° ab, so fällt das Kephalin zum grössten Teil ab. Die Bromverbindung des so isolierten Kephalsins wurde hergestellt und dann die in Äther, Petroläther und Benzol unlösliche abgewägt.

3. Daraus ergab sich, dass das Blutgefäss und das Herz im Vergleich mit den anderen Geweben das betreffende Kephalin in viel höherem Masse enthalten.

*Aus obigen Ergebnissen habe ich den folgenden
Schluss gezogen.*

1. Unter den die Blutgerinnung aktivierende Substanz im Gewebe zusammensetzenden Kephalingen entfaltet das aus der hochungesättigten Fettsäure bestehende die betreffende Wirkung am stärksten.

2. Nach dem Ergebnis der Messung des Kephalsins als Bromverbindung ist das aus der hochungesättigten Fettsäure bestehende Kephalin im Blutgefäss und Herz viel reichlicher als in anderen Geweben enthalten.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Y. Sueyoshi meinen herzlichen Dank für seine Anleitung aus.

LITERATUR.

- Iwasaki, Ohtsuki u. Nakajima (1937): Juzenkwaï-Zassi (Japanisch), 42, 2125. u. 2132.
Koyama (1937): J. Biochem. 25, 141.
Kurosawa (1938): J. Biochem. 28, 297.
Levene u. Rolf (1925): J. Biol. Chem. 65, 545.
Naito (1928): J. Biochem. 9, 45.
Nakajima (1932): Juzenkwaï-Zassi (Japanisch), 37, 2176.

ÜBER DEN GEHALT DER GAWEBE AN HOCHUNGESÄTTIGTEM KEPHALIN BEI DER C-AVITAMINOSE.

VON

YUJI SUEYOSHI UND HIDETANE MICHIMOTO.

(Aus dem Mediz.-chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.)

(Eingegangen am 10. Februar 1939)

EINLEITUNG.

Nach der Untersuchung von Kurosawa (1938) und Michimoto (1939) soll das die Blutgerinnung aktivierende Substanz darstellende Kephalin aus der hochungesättigten Fettsäure bestehen; Michimoto hat dieses unter der Bildung seiner Bromverbindung vom Gewebe isoliert und gemessen. Nach seiner Messung wurde klargestellt, dass es im Gefäß am reichlichsten enthalten ist und dem das Herz folgt. Unserer Ansicht nach ist die Tatsache, dass Kephalin im Gefäß und Herz reichlich enthalten ist, für die schnelle Verhinderung der Blutung in solchen Geweben zweckmässig.

Wir haben die vorliegende Untersuchung vorgenommen, um festzustellen, ob die Menge des die Blutgerinnung aktivierende Substanz darstellenden Kephalin bei den hie und da Blutung zeigenden Geweben von Meerschweinchen, welche infolge C-Avitaminose an Skorbut leiden, in Wirklichkeit variiert oder nicht.

UNTERSUCHUNGSMETHODE.

Zuerst haben wir bei Meerschweinchen (200–250g) durch Fütterung mit Sherman'scher Diät Skorbut erzeugt, um deren Gewebe zur Untersuchung zu benutzen. Zur Kontrolle haben wir die Gewebe der normalen Meerschweinchen, welche neben der Sherman'schen Diät mit frischem Gemüse gefüttert worden waren, in gleicher Weise untersucht.

Die Messung der Kephalinbromverbindung wurde in ganz gleicher Weise wie von Michimoto durchgeführt.

ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG.

Die Messungsergebnisse der benzolunlöslichen Kephalin-Bromverbindung in den Geweben sowohl der gesunden als auch der skorbutischen Meerschweinchen mit der oben angegebenen Methode sind in der folgenden Tabelle angegeben.

TABELLE I.

Gewebe	Normal (mg%)	Skorbut (mg%)
Gefäß	631,8	10,8
Herz	54,2	8,7
Lunge	34,8	9,1
Leber	22,9	8,3
Milz	23,0	8,5
Niere	20,0	8,0
Muskel	11,3	4,2
Blutkörp.(rot.)	9,3	3,9

Aus der obigen Tabelle geht hervor, dass bei den gesunden Meerschweinchen die betreffende Substanz im Gefäß am reichlichsten enthalten ist, dann das Herz folgt und in Muskeln sowie in den Blutzellen am geringsten ist; bei den skorbutischen Meerschweinchen hat sie im Gefäß in hohem Masse abgenommen, indem sie gegenüber 631,8 mg% bei den gesunden Meerschweinchen bis auf 10,8 mg% herabgesetzt ist, nämlich bis auf 1/60 vermindert. In anderen Geweben nimmt sie ebenso ab, doch konnten wir nicht entscheiden, ob die Abnahme bei solchen Geweben auf die starke Abnahme der betreffenden Substanz in darin enthaltenen Blutgefäßen zurückzuführen sei oder nicht, weil uns die vollkommene Entfernung der letzteren von den Geweben unmöglich ist. Aber uns scheint es höchstwahrscheinlich dass die Abnahme in den Gefäßen in hohem Masse daran Anteil hat.

Aus obigen Resultaten können wir wohl schliessen, dass die

hochgradige Abnahme des die Blutgerinnung aktivierenden Kephalins im Gefäss als eine wichtige Ursache für die unstillbare, andauernde Blutung bei den skorbutischen Meerschweinchen angesehen werden kann.

LITERATUR.

Kurosawa (1938): J. Biochem. 28, 297.

Michimoto (1939): J. Biochem. 30, 147.

ÜBER DEN EINFLUSS DER EIWEISSFETTDIÄT AUF DIE HIPPURSÄURESYNTHESE.*

VON

TAKIWO HARA.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. N. Kageura,
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 10. Februar 1939)

Wird Benzoessäure in den Tierkörper eingeführt, so wird diese Säure mit einer Aminosäure gepaart, um dann als gepaarte Verbindung zur Eliminierung zu gelangen. Zur Paarung dient bei den Vögeln Ornithin, wodurch Ornithursäure entsteht, bei den Säugetieren aber Glykokoll, wodurch Hippursäure gebildet wird. Doch gilt das nicht für den Hund,—einen Fleischfresser —, bei dem sich immer ein Teil der eingeführten Benzoessäure mit Glykuronsäure verbindet und dann als Benzoylglykuronsäure zusammen mit der Hippursäure ausgeschieden wird (Quick 1926). Auch betreffs des Ortes der Hippursäurebildung, die als ein synthetischer Entgiftungsvorgang angesehen wird, besteht ein wesentlicher Unterschied je nach der Tierspezies. Während es schon seit langem wohl bekannt ist, dass beim Hunde das Primat dieses Vorgangs bis heute im allgemeinen und fast unbestritten der Niere eingeräumt wird (Bunge u. Schmiedeberg 1876; Hoffmann 1877; Kochs 1879; Bashford u. Cramer 1902; Snapper, Grünbaum u. Neuberg 1924 u.a.m.), ist es in neuerer Zeit klargestellt, dass beim Kaninchen—einem Pflanzenfresser und wohl auch beim Menschen die Synthese sich wesentlich in der Leber vollzieht (Friedmann u. Tachu 1911; Lackner, Levinson u. Morse 1918; Quick 1931 u. 1932; Kanzaki 1933; Sasaki 1933; Adlersberg u. Minibeck 1936 usw.). Nach derartiger Auffassung versuchten manche

* Die vorliegende Mitteilung wurde auf der 36. Tagung der Japanischen Gesellschaft für innere Medizin in Sapporo am 6. April 1939 öffentlich vorgetragen.

Kliniker mit immer zunehmendem Interesse die Fähigkeit, nach Zufuhr von Benzoesäure dieselbe zu entgiften durch Bildung von Hippursäure,—einen Chemismus heute gestützt auf die Leberphysiologie —, als eine neue Methode für die Prüfung der Leberfunktion zur praktischen Anwendung zu bringen (Quick 1933 u. 1936; Adlersberg u. Minibeck 1936; Kohlstaedt u. Helmer 1936; Fouts, Helmer u. Zerfas 1937).

Des weiteren wurde in meiner früheren Untersuchung (März 1938) mitgeteilt, dass das mit gemischter Diät ernährte Kaninchen, wenn 0,5 g Benzoesäure je 1 kg Tier per os belastet, dieselbe nahezu quantitativ in Form von Hippursäure innerhalb 24 Stunden im Harn ausscheiden kann, ferner dass das 5–7 Tage lang fastende Tier dagegen stets die Neigung zu einer Herabsetzung der Hippursäureausscheidung nach gleicher Belastung mit Benzoesäure wie bei gemischter Kost zeigt. Mit anderen Worten lässt sich kurz zusammenfassend sagen: der Hunger setzt die Hippursäuresynthese mehr oder weniger deutlich herab.

Wie ist nun das Verhalten des genannten Vorgangs bei Eiweissfettdiät, die in Verarmung des Kohlehydrates gewissermassen dem Hunger ähnlich ist?

Die hier aufgeworfene Frage scheint mir von weitgehendem Interesse zu sein, da erstens zahlreiche Forscher sicher festgestellt haben, dass sowohl durch Hunger als auch durch Eiweissfettdiät die kohlehydratassimilierende Fähigkeit des Organismus im grossen und ganzen in ausgesprochener Weise geschädigt wird (Bang 1913; Barrensheen 1914; Kageura 1922 u. 1924; Staub 1922; Traugott 1922; Nagasuye 1925; Porges u. Adlersberg 1926 u. 1929; Frank u. Leiser 1929; Ikejiri 1933; Mori 1933; Lee 1933; Matsuoka 1936 u. a.). Ferner wurden aus unserer Klinik noch einige Arbeiten veröffentlicht, die eine Analogie auch in bezug auf die sonstigen chemischen Vorgänge bei Hunger und Eiweissfettdiät nachweisen konnten (Yoshio 1933 u. 1937; Sendju 1937; Ikeda 1938; Sikuma 1939; Ri 1939); und zweitens war Quick (1931) der Meinung, dass der Organismus kein Depot von präformiertem Glykokoll besitze, dass das mit Benzoesäure zu paarende Glykokoll vielleicht hauptsäch-

lich in der Leber aus einer Art von Kohlehydraten unter dem Einfluss von Benzoesäure synthetisiert werde.

Von solchen Erwägungen ausgehend, war schon in Verfassers eigener früherer Mitteilung darauf hingewiesen worden, dass die Minderausscheidung von Hippursäure nach Benzoatbelastung beim Hunger einer mangelhaften Glykokollbildung in der Leber zuzuschreiben sei, die wahrscheinlich wiederum ihrerseits auch nicht unabhängig vom Leberglykogen sein dürfte, da die Leber des dem Hunger ausgesetzten Tieres an Glykogengehalt rasch verarmt und bei solchem Zustand bekanntlich die Leberfunktion eine gewisse Beeinträchtigung erfährt.

Die nachfolgenden Versuche haben den Zweck, den Einfluss der Eiweissfettdiät auf die Hippursäuresynthese nach Belastung mit Benzoesäure und weiterhin die Beziehung zwischen dieser Synthese und dem Glykogenbestand in der Leber eingehend zu studieren und somit gleichzeitig zur Kenntnis des Hippursäurestoffwechsels etwas beizutragen, indem einerseits die Hippursäureausscheidung in Harn nach Benzoatzufuhr und anderseits der Glykogengehalt in der Leber bei verschiedenen Ernährungsweisen vergleichend untersucht wurden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

A. Über Hippursäure.

Als Testobjekt wurde wieder das Kaninchen herangezogen, und die quantitative Untersuchung der Hippursäure im Harn, dem zur Konservierung einige cem Toluol zugesetzt wurden, erfolgte nach dem Verfahren von Kanzaki (1932).

Die Versuchsanordnung und -bedingung geschahen ganz gleich wie in meiner eigenen vorangehenden Arbeit, jedoch selbstverständlich nur mit dem Unterschied, dass das Tier anstatt des Hungers hier mit Eiweissfettdiät gefüttert wurde. Es ist freilich eine von den schwersten Techniken, den Pflanzenfresser mit einseitiger Ernährung wie Eiweissfettdiät zu füttern. Als Material für solche Diät scheint sich am besten das Hühnerei wegen seines Kalorien- und Eiweissfettreichtums zu eignen. Wenn man jedoch

dem Kaninchen nur eine Menge von rohem Ei, die dem Kalorienbedarf des Tieres entspricht, durch Schlundsonde eingab, so starb dasselbe schneller als bei absolutem Hunger unter heftigen Diarrhoeen, rascher Gewichtsabnahme und zuweilen auch geringerer Albuminurie. Es zeigte sich dabei, dass das so ernährte Tier täglich viel konzentriertere Hippursäure (ca. 0,4–0,5 g/dl) im Urin zur Ausscheidung brachte als das mit gemischter Kost ernährte (ca. 0,1 g/dl), was begreiflicherweise darauf hindeutet, dass es sich hier um die im Darm lebhaft stattfindende Fäulnis des zugeführten Hühnereies handelt.

Um diese Schwierigkeit in bezug auf einseitige Ernährungsweise zu überwinden, glückte mir das folgende Verfahren, dessen Prinzip darin besteht, dass man als Fütterungsmaterial der Eiweissfettdiät gekochten Hühnereidotter bevorzugte, der mit Unohana—einem Hauptfutter bei gemischter Kost—im Porzellanmörser völlig gut gemischt wurde, während dem Kaninchen eine Übungsperiode von einer gewissen Anzahl Tagen erlaubt wurde, in welcher jedes Tier täglich je 5 g Eidotter an Stelle von etwa 35 g Unohana zunehmend erhielt, die beide miteinander kalorisch äquivalent sind. Dabei konnten höchstens zwei Drittel des Tageskalorienbedarfs mit Eidotter ersetzt werden, und zwar erwies sich die dementsprechende Menge Dotter dem Kaninchen noch als gut ertragbar, allerdings wenn man auch diese Menge überschreiten wollte, so war das deshalb unmöglich, weil die Fresslust des Tieres dann beträchtlich gestört wurde. Dabei sei noch erwähnt, dass bei dieser Diät an Gemüse, wie bei der gemischten Kost, unabhängig vom Körpergewicht immer 20 g pro Kopf gegeben wurde. Das Körpergewicht jedes Tieres blieb immer annähernd konstant mit so angestellter Kost, die nunmehr der Bequemlichkeit halber vorläufig als „Eiweissfettdiät“ bezeichnet wurde, obgleich die betreffende Diät, wie im folgenden gezeigt, nicht ausschliesslich aus Eiweiss und Fett besteht. Bei dieser Kost wandelte sich die Reaktion des Harns freilich von einer alkalischen in eine saure oder neutrale um. Was nun den Gehalt an den drei Hauptnährstoffen in den beiden genannten Diäten pro kg Körpergewicht pro Tag anlangt, ersehe man aus Tabelle I.

TABELLE I.

TABELLE I.

Kaninchen

Nr.

Körper-
gewicht
in kg

pro Tag
in g

Kohlehydrat
in g (K)

Eiweiss
in g (E)

Fett
in g (F)

K : E : F

K : (E + F)

Ernährungsweise

Diät

pro Kilogramm Körpergewicht

Nr. 18	2,0	{ Unohana 300 { Gemüse 20	9,7	5,8	1,3	100 : 60 : 13	100 : 73	gemischte Kost
		{ Unohana 90 { Eidotter 30 { Gemüse 20	3,1	4,3	5,1	100 : 139 : 165	100 : 304	Eiweissfettdiät
Nr. 19	2,3	{ Unohana 340 { Gemüse 20	9,6	5,7	1,2	100 : 59 : 13	100 : 72	gemischte Kost
		{ Unohana 130 { Eidotter 30 { Gemüse 20	3,8	4,4	4,6	100 : 116 : 121	100 : 237	Eiweissfettdiät
Nr. 20	2,7	{ Unohana 400 { Gemüse 20	9,6	5,7	1,2	100 : 59 : 13	100 : 72	gemischte Kost
		{ Unohana 120 { Eidotter 40 { Gemüse 20	3,0	4,2	5,1	100 : 140 : 170	100 : 310	Eiweissfettdiät
Nr. 23	1,8	{ Unohana 270 { Gemüse 20	9,7	5,8	1,3	100 : 60 : 13	100 : 73	gemischte Kost
		{ Unohana 95 { Eidotter 25 { Gemüse 20	3,6	4,4	4,9	100 : 122 : 136	100 : 258	Eiweissfettdiät
Nr. 25	1,9	{ Unohana 255 { Gemüse 20	9,7	5,8	1,2	100 : 60 : 12	100 : 72	gemischte Kost
		{ Unohana 115 { Eidotter 20 { Gemüse 20	4,5	4,7	4,3	100 : 104 : 96	100 : 200	Eiweissfettdiät

Zwar verminderte sich bei Eiweissfettdiät Kohlehydrat (K) in erheblichem Masse, ebenso ging auch Eiweiss (E) zurück, wenn auch in geringfügigem Masse, dagegen zeigte Fett (F) eine deutliche Zunahme ihrer absoluten Menge nach im Vergleich mit gemischter Nahrung, aber wenn die erwähnten drei Substanzen ihrer relativen Menge nach betrachtet werden, so ergab K : E : F bei der gemischten Diät ein Verhältnis von etwa 100 : 60 : 13, bei der Eiweissfettdiät zwischen 100 : 104 : 96 und 100 : 140 : 170, dementsprechend verhielt sich K : (E + F) bei jener wie 100 : 73, bei dieser zwischen 100 : 200 und 100 : 310. Also war das Verhältnis von (E + F) zu K bei der letzteren etwa 3 bis 4fach grösser als bei der ersteren.

Schliesslich kommt noch in Betracht, dass als Giftwirkung der Benzoesäure, wenn 0,5 g Säure pro kg Körpergewicht verabreicht wurde, kein nennenswertes Symptom bei allen Fällen in die Augen fiel.

Auf diese Weise wurden, ganz genau wie in der früheren Arbeit mitgeteilt, diejenigen zwei Prozentsätze bei den obengenannten zwei Ernährungsperioden an ein und demselben Tier miteinander vergleichend verfolgt, die gerade darauf hinweisen, eine wie grosse Menge von belastender Benzoesäure in Form von Hippursäure im Urin ausgeschieden wird. Die Versuche wurden bei 5 Tieren angestellt. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen II–VI aufgestellt und der Kürze und Übersichtlichkeit halber in Tabelle VII zusammenfassend aufgezeigt. Aus den Daten der Tabellen II–VI, in denen die Versuche getreulich wiedergegeben sind, kann man auch sonstige Feststellungen machen.

B. Über Leberglykogen.

Auf Grund der schon eingangs gebrachten Beobachtungen wurde der Glykogengehalt der Leber bei drei Ernährungsweisen — nämlich bei gemischter Kost, Eiweissfettdiät und Hunger — untersucht. Die Bestimmung des Leberglykogens geschah nach der Methode von Iwasaki-Mori (1922), bei welcher aber das Verfahren von Hagedorn-Jensen (1923) mitbenutzt wurde. Die Tiere wurden durch künstliche Luftembolie getötet, und so

TABELLE II.
Kaninchen Nr. 18, grau, ♂.

Datum 1938	Körper- gewicht in g	Diät	Harn				Anmerkungen
			Menge in ccm	Reakt.	Eiweiss	Hippur- säure in g	
10/IX	1970	{Unohana 300g Gemüse 20g	147	alkal.	(-)	0,1776	} im Durch- schnitt 0,2021 g
11/ "	1930		203	"	"	0,2235	
12/ "	1910		176	"	"	0,1890	
13/ "	1960		218	"	"	0,2184	
14/ "	1950	"	242	"	"	1,6028	11,8 g/dl Na- Benzoat-Lsg. 10 ccm per os §
15/ "	1880	"	103	"	"	0,2028	
16/ "	1975	"	213	"	"	0,2173	
17/ "	1930	"	202	"	"	0,2206	

21/IX—25/IX Übungsperiode von Eiweissfettdiät

26/ "	1960	{Unohana 90g Eidotter 30g Gemüse 20g	140	sauer	(-)	0,2230	} im Durch- schnitt 0,1817 g
27/ "	1900		0	—	—	0	
28/ "	1960		58	sauer	(-)	0,2045	
29/ "	1970		96	"	"	0,2878	
30/ "	1965		0	—	—	0	
1/X	2050		126	sauer	(-)	0,3586	
2/ "	1970		0	—	—	0	
3/ "	2050		182	sauer	(-)	0,3795	
4/ "	1970	"	116	"	"	1,5615	11,8g/dl Na- Benzoat-Lsg. 10 ccm per os (+ H ₂ O 30 ccm) §
5/ "	1935	{Unohana 300g Gemüse 20g	119	neutral	"	0,1012	4/X Fresslust etwas verab- gesetzt
6/ "	2000		144	alkal.	"	0,1096	
7/ "	2045		248	"	"	0,2220	

§ 24 Stunden nach der Belastung katheterisiert.

* Gerhardtse und Legalsche Probe negativ, auch Indikanreaktion
ebenso. (3/X)

TABELLE III.

Kaninchen Nr. 19, schwärzlich braun, ♂.

Datum 1938	Körper- gewicht in g	Diät	Harn				Anmerkungen
			Menge in cem	Reakt.	Eiweiss	Hippur- säure in g	
19/IX	2260	{ Unohana 340g Gemüse 20g	243	alkal.	(-)	0,1915	} im Durch- schnitt 0,2037 g
20/ "	2270		234	"	"	0,2366	
21/ "	2235		158	"	"	0,2122	
22/ "	2270		174	"	"	0,1744	
23/ "	2300	"	255	"	"	1,8714	11,8 g/dl Na- Benzoat-Lsg. 12 cem per os §
24/ "	2275	"	158	"	"	0,2022	
25/ "	2320	"	208	"	"	0,2122	
26/ "	2290	"	188	"	"	0,2188	

29/IX—3/X Übungsperiode von Eiweissfettdiät

4/X	2320	{ Unohana 130g Eidotter 30g Gemüse 20g	78	alkal.	(-)	0,1815	} im Durch- schnitt 0,1458 g
5/ "	2290		50	neutral	"	0,1276	
6/ "	2300		64	alkal.	"	0,1260	
7/ "	2300		53	sauer	"	0,1404	
8/ "	2305		68	alkal.	"	0,1461	
9/ "	2305		70	"	"	0,1529	
10/ "	2340	"	95	sauer	"	1,5746	11,8 g/dl Na- Benzoat-Lsg. 12 cem per os (+ H ₂ O 30 cem) §
11/ "	2270	{ Unohana 340g Gemüse 20g	98	"	"	0,1596	
12/ "	2370		209	alkal.	"	0,2094	
13/ "	2340		165	"	"	0,1832	
14/ "	2360		226	"	"	0,2084	

§ Wie in Tabelle I.

* Gerhardt'sche und Legalsche Probe negativ, auch Indikanreaktion ebenso. (9/X)

TABELLE IV.

Kaninchen Nr. 20, grau, ♂.

Datum 1938	Körper- gewicht in g	Diät	Harn				Anmerkungen
			Menge in ccm	Reakt.	Eiweiss	Hippur- säure in g	
27/X	2690	{Unohana 400g Gemüse 20g	248	alkal.	(—)	0,2397	} im Durch- schnitt 0,2348 g
28/ "	2710		342	"	"	0,2418	
29/ "	2680		282	"	"	0,2346	
30/ "	2695		242	"	"	0,2231	
31/ "	2730	"	363	"	"	2,0662	11,8 g/dl Na- Benzoat-Lsg. 14 ccm per os §
1/XI	2600	"	198	"	"	0,2198	
2/ "	2670	"	180	"	"	0,1692	
3/ "	2770	"	238	"	"	0,2023	
4/ "	2830	"	292	"	"	0,2301	
7/XI—13/XI Übungsperiode von Eiweissfettdiät							
14/ "	2740	{Unohana 120g Eidotter 40g Gemüse 20g	95	sauer	(—)	0,2106	} im Durch- schnitt 0,2016 g 17/XI, 18/XI Fresslust etwas herabgesetzt *
15/ "	2750		76	"	"	0,1836	
16/ "	2770		60	"	"	0,1923	
17/ "	2780		55	"	"	0,2152	
18/ "	2700		50	"	"	0,1916	
19/ "	2650		56	"	"	0,2165	
20/ "	2700	"	176	"	"	1,8802	11,8 g/dl Na- Benzoat-Lsg. 14 ccm per os (+ H ₂ O 30 ccm) §
21/ "	2595	{Unohana 400g Gemüse 20g	0	—	—	0	
22/ "	2800		402	alkal.	(—)	0,3240	
23/ "	2690		236	"	"	0,1860	
24/ "	2720		268	"	"	0,2425	

§ Wie in Tabelle I.

* Gerhardtsche und Legalsche Probe negativ, Indikanreaktion schwach positiv. (19/XI)

TABELLE V.
Kaninchen Nr. 23, schwarz, ♂.

Datum 1938	Körper- gewicht in g	Diät	Harn				Anmerkungen
			Menge in ccm	Reakt.	Eiweiss	Hippur- säure in g	
12/XI	1830	{Unohana 270g Gemüse 20g	240	alkal.	(-)	0,2105	} im Durch- schnitt 0,1938 g
13/ "	1810		195	"	"	0,1886	
14/ "	1800		205	"	"	0,2019	
15/ "	1770		162	"	"	0,1740	
16/ "	1780	"	253	"	"	1,3857	11,8 g/dl Na- Benzoat-Lsg. 9 ccm per os §
17/ "	1720	"	154	"	"	0,1585	
18/ "	1740	"	198	"	"	0,1950	
19/ "	1750	"	226	"	"	0,1860	
20/ "	1770	"	192	"	"	0,1958	

26/XI—29/XI Übungsperiode von Eiweissfettdiät

30/XI	1840	{Unohana 95g Eidotter 25g Gemüse 20g	104	neutral	(-)	0,1880	} im Durch- schnitt 0,1392 g
1/XII	1820		52	sauer	"	0,1052	
2/ "	1860		122	"	"	0,1769	
3/ "	1810		70	"	"	0,1140	
4/ "	1820		81	"	"	0,1276	
5/ "	1880		72	"	"	0,1289	
6/ "	1840		82	"	"	0,1336	
7/ "	1835	"	134	"	"	1,1082	11,8 g/dl Na- Benzoat-Lsg. 9 ccm per os (+ H ₂ O 30 ccm) §
8/ "	1770	{Unohana 270g Gemüse 20g	126	neutral	"	0,1352	
9/ "	1850		156	alkal.	"	0,1591	
10/ "	1870		251	"	"	0,2005	
11/ "	1880		210	"	"	0,1936	

§ Wie in Tabelle I.

* Gerhardtsche und Legalsche Probe negativ, auch Indikanreaktion ebenso. (6/XII)

TABELLE VI. *
Kaninchen Nr. 25, bräunlich weiss, ♂.

Datum 1938	Körper- gewicht in g	Diät	Harn				Anmerkungen
			Menge in ccm	Reakt.	Eiweiss	Hippur- säure in g	
1/XII	1700	{ Unohana 255g Gemüse 20g	168	alkal.	(-)	0,1655	} im Durch- schnitt 0,1770 g
2/ "	1710	"	209	"	"	0,1946	
3/ "	1685	"	190	"	"	0,1720	
4/ "	1710	"	182	"	"	0,1760	
5/ "	1725	"	243	"	"	1,3744	11,8 g/dl Na- Benzoat-Lsg. 9 ccm per os §
6/ "	1655	"	178	"	"	0,1561	
7/ "	1660	"	178	"	"	0,1826	
8/ "	1690	"	165	"	"	0,1787	

10/XII—12/XII Übungsperiode von Eiweissfettdiät

13/XII	1665	{ Unohana 115g Eidotter 20g Gemüse 20g	74	neutral	(-)	0,1643	} im Durch- schnitt 0,1408 g
14/ "	1720	"	62	"	"	0,1021	
15/ "	1600	"	65	"	"	0,1047	
16/ "	1655	"	102	"	"	0,1387	
17/ "	1685	"	101	"	"	0,1501	} 14/XII Fress- lust etwas herabgesetzt
18/ "	1675	"	92	"	"	0,1663	
19/ "	1705	"	104	"	"	0,1498	
20/ "	1700	"	80	"	"	0,1504	
21/ "	1720	"	142	sauer	"	1,2098	11,8 g/dl Na- Benzoat-Lsg. 9 ccm per os (+ H ₂ O 30 ccm) §
22/ "	1650	{ Unohana 255g Gemüse 20g	132	alkal.	"	0,1158	
23/ "	1670	"	186	"	"	0,1581	
24/ "	1705	"	184	"	"	0,1844	
25/ "	1700	"	217	"	"	0,1964	

§ Wie in Tabelle I.

* Gerhardttsche und Legalische Probe negativ, auch Indikanreaktion ebenso. (20/XII)

schnell wie möglich ihre Lebern zur Analyse gebracht, da sich das Glykogen nach dem Tode relativ rasch zersetzt. Alle Versuchsbedingungen wurden hier selbstverständlich in möglichst genau derselben Weise eingestellt, wie bei den vorangegangenen sowie vorliegenden Untersuchungen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen VIII-X zusammengestellt.

RESULTATE.

Aus den Daten der Tabellen ist es ersichtlich, dass die Tagesmenge von Hippursäure bei bestimmter gemischter Kost an demselben Tier annähernd konstant war, während die bei Eiweissfettdiät mehr oder weniger ab- und zunahm; doch war der Wert bei der letzteren Diät stets etwas geringer als der bei der ersteren, was vielleicht auf eine Verminderung der Muttersubstanzen der Benzoessäure im Futter zurückzuführen ist.

Wenn man nun die Resultate der Belastungsversuche übersieht, so ergab sich bei der gemischten Diät eine fast quantitative Ausscheidung der zugefütterten Benzoessäure in Form von Hippursäure, indem man 89,2–95,5%, im Durchschnitt 92,1%, von der eingegebenen Benzoessäure als Hippursäure im Harn wieder gefunden hat, wie aus Tabelle VII hervorgeht. Diese Ergebnisse stehen im besten Einklang mit denen von Lewinski (1908), Dakin (1910), Lewis (1914), Raiziss und Dubin (1915), Kingsbury und Swanson (1921), Neuberg (1924), Snapper (1924), Brakefield (1927) und von Verfasser selbst (1938), die alle bei Menschen oder Kaninchen ganz Ähnliches beobachten konnten. Wie Tabelle VII weiter zeigt, schieden die 6–8 Tage lang mit Eiweissfettdiät ernährten Kaninchen nun 73,4–94,0%, im Mittel 82,2%, von der verabreichten Benzoessäure in Form von Hippursäure aus, und zwar wenn man bei ein und demselben Tier die nach stets gleicher Benzoessäurebelastung erfolgte Hippursäureausscheidung sowohl bei gemischter Diät als auch bei Eiweissfettdiät miteinander näher vergleicht, so ist mit Nachdruck hervorzuheben, dass alle Versuchstiere ohne Ausnahme eine Minderausscheidung von Hippursäure bei der Eiweissfettdiät im Vergleich

TABELLE VII.

Kaninchen Nr. Geschlecht	Ernährungsweise	oral ver- abreichte Benzoe- säure	Hippursäure im Urine			Herabsetzung bei Eiweissfettdiät % (E-N)
			gefunden	ungerechnet in Benzoessäure		
				g (A)	g	
Nr. 18 ♂	bei gemischter Kost	1,0	1,4007	0,9546	95,5 (N)	-1,5
	bei Eiweissfettdiät	1,0	1,3798	0,9403	94,0 (E)	
Nr. 19 ♂	bei gemischter Kost	1,2	1,6677	1,1365	94,7 (N)	-13,6
	bei Eiweissfettdiät	1,2	1,4288	0,9737	81,1 (E)	
Nr. 20 ♂	bei gemischter Kost	1,4	1,8314	1,2481	89,2 (N)	-7,5
	bei Eiweissfettdiät	1,4	1,6786	1,1440	81,7 (E)	
Nr. 23 ♂	bei gemischter Kost	0,9	1,1919	0,8123	90,3 (N)	-16,9
	bei Eiweissfettdiät	0,9	0,9690	0,6604	73,4 (E)	
Nr. 25 ♂	bei gemischter Kost	0,9	1,1974	0,8160	90,7 (N)	-9,8
	bei Eiweissfettdiät	0,9	1,0690	0,7285	80,9 (E)	
im Mittel					N=92,1 E=82,2	-9,9

TABELLE VIII.

Bei gemischter Kost

Kaninchen Nr. Geschlecht Haarfarbe	Versuchs- datum 1939	Körper- gewicht in g	Ernährungsweise		Leber	
			gemischte Kost	nach letzter Mahlzeit	Gewicht in g	Glykogen in %
Nr. 36 ♀ grau	24/II	2150	über 1 Woche	24 Stunden	53,5	0,85
Nr. 44 ♂ braun	"	1760	lang	"	48,0	1,25
Nr. 32 ♂ braun	25/II	2080	"	"	52,0	0,97
Nr. 42 ♂ weiss	"	2750	"	"	63,5	1,44
im Mittel						1,13
Nr. 34 ♂ weiss	26/II	3050	über 1 Woche	5 Stunden	83,5	1,98
Nr. 40 ♀ braun	"	2545	lang	"	71,5	1,62
Nr. 43 ♀ braun	"	2500	"	"	63,0	1,74
im Mittel						1,78

TABELLE IX.
Bei Eiweissfettdiät

Kaninchen Nr. Geschlecht Haarfarbe	Versuchs- datum 1939	Körper- gewicht in g	Ernährungsweise		Leber	
			Eiweiss- fettdiät	nach letzter Mahlzeit	Gewicht in g	Glykogen in %
Nr. 28 ♂ braun	18/II	2050	6 Tage lang	24 Stunden	49,5	1,15
Nr. 29 ♂ grau	"	1910	7 " "	"	43,0	0,61
Nr. 30 ♂ grau	"	1920	8 " "	"	52,5	0,75
im Mittel						0,84
Nr. 27 ♂ schwarz	21/II	1890	7 Tage lang	5 Stunden	55,5	1,51
Nr. 31 ♂ braun	"	2115	7 " "	"	51,0	1,49
Nr. 33 ♂ braun	"	2340	8 " "	"	76,5	1,23
im Mittel						1,41

TABELLE X.
Bei Hunger

Kaninchen Nr. Geschlecht Haarfarbe	Versuchs- datum 1939	Körpergewicht in g		Ernährungs- weise	Leber	
		vor	nach		Gewicht in g	Glykogen in %
		dem Hunger				
Nr. 37 ♂ grau	1/III	2130	1835	am 5. Hungertag	51,0	0,47
Nr. 35 ♂ braun	28/II	2400	2020	" 6. "	44,5	0,59
Nr. 38 ♂ weiss	2/III	3000	2560	" 6. "	71,0	0,56
Nr. 41 ♂ grau	"	2210	1830	" 6. "	46,0	0,68
Nr. 39 ♂ weiss	"	3250	2465	" 8. "	70,5	0,40
im Mittel						0,54

mit der gemischten Ernährung zur Folge hatten (als Prozentsatz betrachtet, um 16,9–1,5%, durchschnittlich 9,9% minder).

Zwar verminderte sich die Tagesharnmenge in auffallender Weise bei Eiweissfettdiät bzw. Hunger, doch steht die Hippur-säureausscheidung zur Menge des Harns, wie schon in der früheren Mitteilung eingehend erörtert wurde, im grossen und ganzen in keinem direkten Verhältnis.

An dem der zweiten Benzoatbelastung bei Eiweissfettdiät

vorhergehenden Tag wurde der Harn auf etwaiges Vorhandensein von Acetonkörpern mittels Gerhardtscher und Legalscher Probe untersucht, die beide aber bei allen 5 Fällen immer negativ ausfielen; gleichzeitig wurde ferner auf Indikan geprüft, das man bei 4 Fällen vermisste, nur der Harn vom Kaninchen Nr. 20 zeigte eine schwach positive Indikanprobe. Aus diesen Prüfungen kann man leicht die folgenden Schlüsse ziehen, dass die Eiweissfettdiät keine Ketosis hervorrief, dass im Darm des mit solcher Diät ernährten Kaninchens ein eiweissfaulender Prozess, der für die Entstehung von Benzoesäure innerhalb des Organismus von Bedeutung ist, gar nicht oder nur wenig stattfand.

Was schliesslich den Glykogenbestand in der Leber bei verschiedenen Ernährungsweisen betrifft, so ergibt sich aus den Tabellen VIII-X, dass bei gemischter Diät der durchschnittliche Leberglykogenwert einer Versuchsgruppe 24 Stunden nach der letzten Mahlzeit (also morgens nüchtern) 1,13% betrug, der einer anderen 5 Stunden nach der letzten Mahlzeit 1,78%, bei Eiweissfettdiät resp. 0,84% und 1,41%, bei 5-8 Tage langem Hunger 0,54%. Nämlich nahm das Leberglykogen, wie erwartet, sowohl bei Eiweissfettdiät wie auch bei Hunger, bei letzterem natürlich in höherem Grade, ziemlich deutlich ab im Vergleich zu dem bei gemischter Kost.

BESPRECHUNG.

Mit den mannigfaltigsten Zwecken beschäftigten sich eine Reihe Autoren mit Forschungen über die nach Benzoesäurezufuhr vor sich gehende Hippursäuresynthese, um zu erfahren, in welcher Art und Weise die genannte Synthese durch entweder verschiedene Ernährungsweisen oder gleichzeitigen Zusatz von einzelnen Nährstoffen zur Benzoesäure beeinflusst wird. Die sich darauf beziehenden umfangreichen Untersuchungen gehen zur Zeit noch ziemlich weit auseinander.

Abderhalden und Wertheimer (1924) überprüften bei Tieren den Einfluss verschiedener Nahrung auf den quantitativen Verlauf der Hippursäuresynthese und kamen zu dem Ergebnis, dass sauer ernährte Kaninchen viel reichlicher Hippursäure nach

Benzoessäureverabreichung synthetisieren als basisch ernährte. Dieses Beispiel für den Einfluss der Nahrung auf den synthetischen Vorgang im Organismus fiel indessen weg, seit Griffith (1925) gezeigt hat, dass solcher Befund auf einem methodischen Fehler in der Hippursäurebestimmung beruht. So erkannten später Abderhalden und sein Mitarbeiter (1925) selbst auch ihr Resultat als Irrtum an.

Schon 1898 machte Wiener die Beobachtung, dass wenn Benzoessäure als Natriumsalz einem Kaninchen mit der Schlundsonde eingeführt wird, sich dann 1,7 g Benzoessäure pro Kilo Kaninchen als Dosis letalis erweist, bei gleichzeitiger Injektion von Glykokoll aber selbst 2,4 g entgiftet wird. In Bezug hierauf gibt es noch zahlreiche Arbeiten. Bei Darreichung von Benzoat behauptet die Mehrzahl der Autoren, dass ganz allgemein nach gleichzeitiger Zufuhr von Glykokoll selbst oder von glykokollreichen Eiweisskörpern wie z.B. Gelatine sich die Hippursäuresynthese bzw.-ausscheidung steigert, ferner dass gleichzeitige Fütterung von sonstigen verschiedenen Aminosäuren oder von glykokollarmen Proteinkörpern wie Casein oder Eiereiweiss dagegen fast keinen oder nur geringfügigen Einfluss auf die Bildung der betreffenden Säure ausübt (Epstein u. Bookman 1912 u. 1914; Abderhalden u. Strauss 1914; Griffith u. Lewis 1923; Csonka 1924; Quick 1926). Zu diesen Beobachtungen stehen die Angaben von einer anderen Reihe von Forschern im Gegensatz, die bei gleichzeitiger Zugabe von Benzoat und Glykokoll oder glykokollreichen Eiweisskörpern festgestellt haben, dass die dabei erfolgende Hippursäurebildung genau so bleibt, als ob Benzoat allein gegeben worden wäre (Parker u. Lusk 1900; Friedmann u. Tachu 1911). Ausserdem beobachtete Lewinski (1908) nach Benzoessäurebelastung eine Mehrausscheidung von Hippursäure bei eiweissreicher Kost im Vergleich mit eiweissarmer. Nach Raiziss und Dubin (1915) schied das mit Benzoessäure gefütterte Kaninchen bei Milch-Eier-Rohrzuckerfutter mehr Hippursäure aus als bei Grünfutter. Andererseits fanden Griffith und Lewis (1923) keine Vermehrung der ausgeschiedenen Hippursäure bei gleichzeitiger Einführung von Trauben-

zucker und Benzoat in den Organismus des Kaninchens gegenüber dem Kontrollversuche.

In den Arbeiten von Widmark (1926) wurde die Frage des Einflusses der Nahrung auf die Hippursäuresynthese wieder aufgegriffen. Er zeigte in seinen mit einer einwandfreien Methodik ausgeführten Versuchen, dass beim gesunden Menschen bei Ausschaltung der Kohlehydrate aus der Nahrung, bei welcher Acidosis hervorgerufen wird, die zugeführte Benzoesäure sich ungenügend zur Hippursäure vereinigt. Gestützt auf diese Versuche stellte sich Widmark ferner die Frage, ob nicht die Synthese der Hippursäure aus Glykokoll und Benzoesäure bei gleichzeitig herabgesetzter Verbrennung von Kohlehydraten im Organismus erschwert sein könnte. Als Analogon führte er die mangelhafte Verbrennung der Fettsäuren unter Bildung von Acetonkörpern bei Kohlehydratmangel an. Bei Diabetes mellitus, also bei einem Zustand, bei dem bekanntlich der Kohlehydratstoffwechsel gestört ist, teilte Bergwall (1930) mit, dass Diabetes immerhin nicht ohne Einfluss auf die Hippursäuresynthese ist, und zwar dass das Zurücktreten der diabetischen Störung eine Förderung der Hippursäurebildung nach Benzoesäurebelastung mit sich bringt. Im Gegensatz hierzu steht gerade die Beobachtung von Adlersberg und Minibeck (1936), die bei Diabetikern nach Benzoatgabe vielmehr eine gesteigerte Hippursäuresynthese im Vergleich zur Norm feststellen konnten. Vor kurzem sahen Sendju und Sikuma (1939) bei Hungerhunden eine Störung der Glykokollpaarung der durch Oxydation von Phenylpropionsäure sowie Benzaldehyd im Organismus zustande gekommenen Benzoesäure, bei mit Eiweissfettdiät gefütterten Hunden dagegen keine solche Störung.

Diese Inkongruenz der literarischen Angaben könnte wesentlich in der Verschiedenheit der Untersuchungsbedingungen, vor allem in den verschiedenen Spezies der Versuchstiere und in den verschiedenen Belastungsmengen von Benzoesäure pro kg Körpergewicht, ihre Erklärung finden. Allerdings ist niemals im Schrifttum in einem Sinne wie hier, wo die vorliegende Untersuchung angestellt wurde, von einer Beeinflussung der

Hippursäuresynthese durch die Ernährung gesprochen worden.

Aus meiner Untersuchung geht als bemerkenswert hervor, dass die Eiweisskörper im Hühnereidotter, der als Material von Eiweissfettdiät benutzt wurde, kein oder nur wenig Glykokoll enthalten, dass diese Eiweissfettdiät keine Ketosis bzw. Acidosis im Tierkörper verursachte und ferner keine oder nur geringfügige Darmfäulnis hervorrief. Nämlich die Ergebnisse der vorliegenden am Kaninchen ausgeführten Arbeit stehen in Unabhängigkeit vom Glykokollreichtum im Futter, von Ketosis und von Darmfäulnis; alle diese Faktoren können, wie schon oben näher erwähnt wurde, auf die Hippursäuresynthese bald fördernd, bald hemmend wirken. Ferner sei nachdrücklich betont, dass die Eiweissfettdiät den Effekt hat, die hippursäurebildende Fähigkeit des Tieres nach Belastung mit Benzoesäure herabzusetzen, was schon früher von mir auch beim Hunger festgestellt wurde. So verhält sich der Hippursäurestoffwechsel sowohl bei Eiweissfettdiät als auch bei Hunger ganz ähnlich.

Die Möglichkeit, einen etwaigen Zusammenhang zwischen dem Leberglykogen und der hippursäuresynthetisierenden Kraft im Organismus vermuten zu lassen, wurde schon anfangs ausführlich in Erwägung gezogen. Hierzu kommt weiter, dass sich in der Tat der Leberglykogenbestand bei Hunger sowie bei Eiweissfettdiät, wie in den Tabellen VIII-X gezeigt, als ziemlich deutlich vermindert erwies im Vergleich mit gemischter Kost. Mit anderen Worten scheint es, dass zwischen der Hippursäuresynthese und dem Leberglykogen im quantitativen Sinne des Wortes ein Parallelismus besteht. Von den eben gebrachten Beobachtungen ausgehend, liegt es nahe, anzunehmen, dass zwischen der mangelhaften Hippursäuresynthese und der Glykogenverarmung in der Leber bei Hunger und Eiweissfettdiät ein inniger Zusammenhang bestehen dürfte. Die Frage, durch welchen Weg sich die beiden Phänomene denn miteinander direkt verkoppeln, bleibt zur Zeit noch offen, was weiterer Erforschung bedarf.

ZUSAMMENFASSUNG.

Bei Kaninchen wurden folgende Ergebnisse erhalten.

1. Sowie es beim Hunger der Fall ist, ist die täglich ausgeschiedene Hippursäure auch bei der Eiweissfettdiät ihrer Menge nach immer geringer als die bei der gemischten Kost.

2. Wenn mit 0,5 g Benzoesäure je 1 kg Tier per os belastet wurde, so zeigt das Kaninchen in der Periode von der Eiweissfettdiät stets die Neigung zu einer Herabsetzung der Hippursäureausscheidung bzw.-synthese im Vergleich mit der Periode von gemischter Kost.

3. Die Eiweissfettdiät hat den gleichen Effekt in bezug auf den quantitativen Verlauf der Hippursäuresynthese, also einen in der Leber stattfindenden Entgiftungsvorgang, wie der Hunger.

4. Zwischen der Herabsetzung der Hippursäurebildung in der Leber und der Verarmung an Leberglykogen sowohl bei Eiweissfettdiät als auch bei Hunger dürfte eine tiefere Beziehung bestehen.

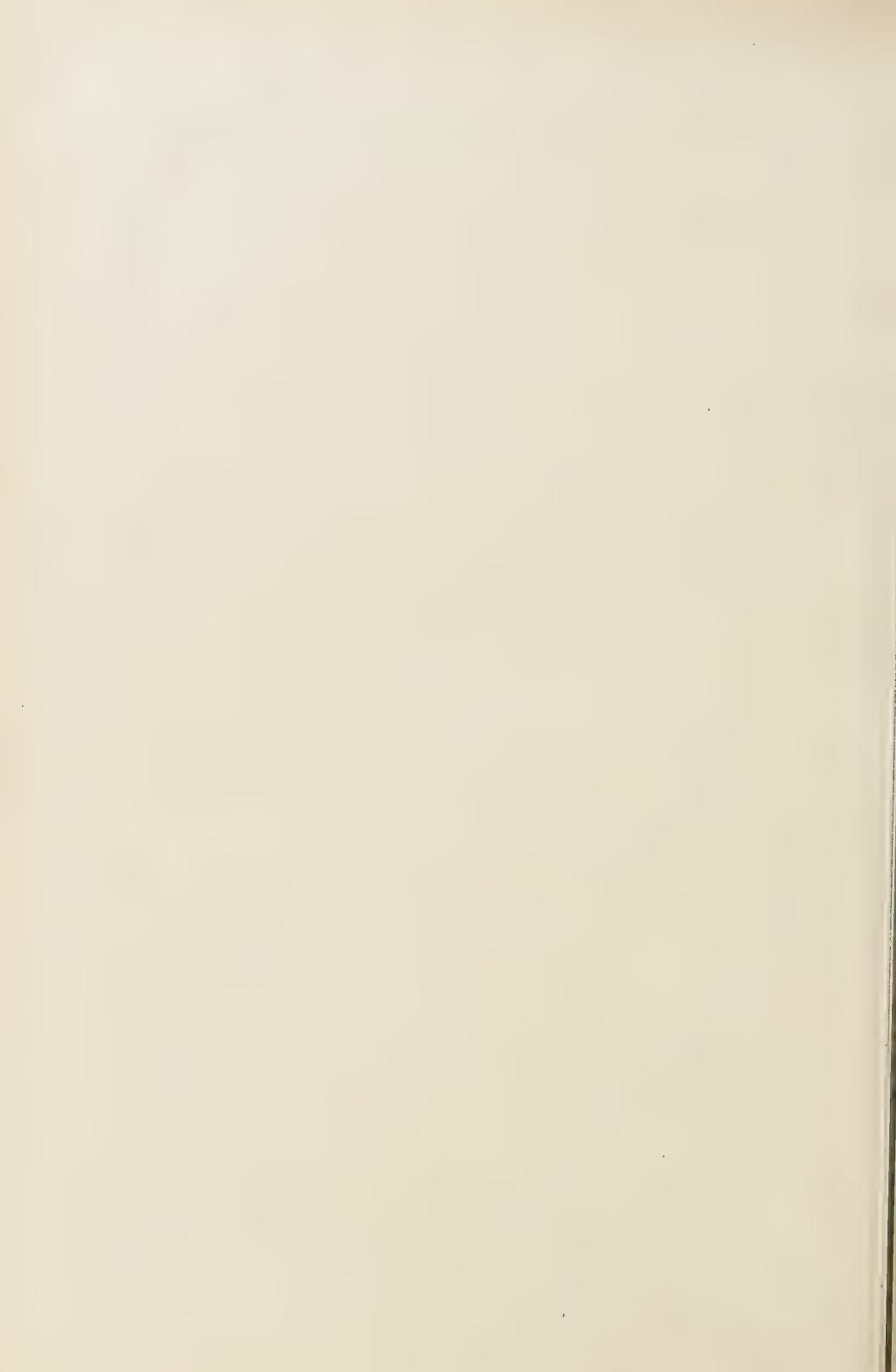
Zum Schluss erlaube ich mir, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. N. Kageura für seine gütige Anregung und liebenswürdige Unterstützung bei der vorstehenden Arbeit auch hier meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. H. Strauss (1914): Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem., **91**, 81.
Abderhalden, E. u. E. Wertheimer (1924): Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., **206**, 460.
Abderhalden, E. u. E. Wertheimer (1925): Ebenda, **209**, 611.
Adlersberg, D. u. H. Minibeck (1936): Z. exper. Med., **98**, 185.
Adlersberg, D. u. H. Minibeck (1936): Z. klin. Med., **129**, 392.
Adlersberg, D. u. O. Porges (1926): Klin. Wschr., **5**, 1451 u. 1508.
Bang, I. (1913): Der Blutzucker, Wiesbaden.
Barrenscheen, H. K. (1914): Biochem. Z., **58**, 277.
Bashford, E. u. W. Cramer (1902): Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem., **35**, 324.
Bergwall, A. (1930): Z. exper. Med., **74**, 211.
Brakefield, J. L. (1927): J. biol. Chem., **74**, 783.

- Bunge, G. u. O. Schwiedeberg (1876): Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol., **6**, 233.
- Csonka, F. A. (1924): J. biol. Chem., **60**, 545.
- Dakin, H. D. (1910): Ebenda, **7**, 103.
- Epstein, A. A. u. S. Bookman (1912-13): Ebenda, **13**, 117.
- Epstein, A. A. u. S. Bookman (1913-14): Ebenda, **17**, 455.
- Fouts, P. J., O. M. Helmer u. L. G. Zerfas (1937): Amer. J. med. Sci., **193**, 647, Ref. Kongresszentralbl. f. d. ges. inn. Med., **91**, 490.
- Frank, E. u. R. Leiser (1929): Med. Klinik, **25**, 1841.
- Friedmann, E. u. H. Tachu (1911): Biochem. Z., **35**, 88.
- Griffith, W. H. (1925): J. biol. Chem., **64**, 401.
- Griffith, W. H. u. H. B. Lewis (1923): Ebenda, **57**, 1 u. 697.
- Hagedorn, H. C. u. B. N. Jensen (1923): Biochem. Z., **135**, 46.
- Hara, T. (1938): Journ. of Biochem., **27**, 157.
- Hoffmann, A. (1877): Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol., **7**, 233.
- Ikeda, G. (1938): Journ. of Biochem., **27**, 141.
- Ikejiri, K. (1933): Nagasaki Igakkwai Zasshi, **11**, 1173.
- Iwasaki, T. u. M. Mori (1922): zit. n. K. Suto, Sho-Ikagaku Jisshu, **11**, Aufl., Tokyo, 234.
- Kageura, N. (1922): Journ. of Biochem., **1**, 333 u. 389.
- Kageura, N. (1924): Ebenda, **3**, 205.
- Kanzaki, I. (1932): Ebenda, **16**, 105.
- Kanzaki, I. (1933): Seikai Zasshi, **52**, 85.
- Kingsbury, F. B. u. W. W. Swanson (1921): Arch. int. Med., **28**, 220.
- Kochs, W. (1879): Pfügers Arch. f. d. ges. Physiol., **20**, 64.
- Kohlstaedt, K. G. u. O. M. Helmer (1936): Amer. J. digest. Dis. a. Nutrit., **3**, 459, Ref. Kongresszentralbl. f. d. ges. inn. Med., **88**, 615.
- Lackner, E., A. Levinson u. W. Morse (1918): J. biol. Chem., **33**, xvi (Vortrag).
- Lee, T. (1933): Tokyo Igakkwai Zasshi, **47**, 1961.
- Lewinski, J. (1907-8): Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol., **58**, 397.
- Lewis, H. B. (1914): J. biol. Chem., **18**, 225.
- Matsuoka, Y. (1936): Journ. of Biochem., **23**, 161 u. 171.
- Mori, S. (1933): Tokyo Igakkwai Zasshi, **47**, 1804.
- Nagasuye, S. (1925): Journ. of Biochem., **5**, 449.
- Neuberg, J. (1924): Biochem. Z., **145**, 249.
- Parker, W. H. u. G. Lusk (1899-1900): Amer. Journ. Physiol., **3**, 472.
- Porges, O. u. D. Adlersberg (1929): Wien. Arch. inn. Med., **17**, 1.
- Quick, A. J. (1926): J. biol. Chem., **67**, 477.
- Quick, A. J. (1926): Ebenda, **69**, 549.
- Quick, A. J. (1931): Ebenda, **92**, 65.
- Quick, A. J. (1932): Ebenda, **96**, 73.
- Quick, A. J. (1933): Amer. J. med. Sci., **185**, 630.
- Quick, A. J. (1936): Arch. int. Med., **57**, 544.

- Raiziss, G. W. u. H. Dubin (1915): J. biol. Chem., **21**, 331.
- Ri, K. (1939): Vortrag in d. 36. Versammlung d. Japan. Gesellsch. f. inn. Med. in *Sapporo*.
- Sasaki, S. (1933): Journ. of Gastroenterol., **8**, 1383.
- Sendju, Y. (1937): Journ. of Biochem., **25**, 487.
- Sendju, Y. u. K. Sikuma (1939): Ebenda, **29**, 179.
- Sikuma, K. (1939): Nagasaki Igakkwai Zasshi, **17**, 35.
- Snapper, I. (1924): Klin. Wschr., **3**, 55.
- Snapper, I., A. Grünbaum u. J. Neuberg (1924): Biochem. Z., **145**, 40.
- Staub, H. (1922): Z. klin. Med., **93**, 89 u. 123.
- Traugott, K. (1922): Klin. Wschr., **1**, 892.
- Widmark, F. M. P. (1926): Biochem. Z., **179**, 272.
- Wiener, H. (1898): Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol., **40**, 313.
- Yoshio, K. (1933): Journ. of Biochem., **17**, 11.
- Yoshio, K. (1937): Ebenda, **26**, 49.



BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XLIX. Submaxillary Mucin and Mucoid.

By

YASUHISA TANABE.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, February 13, 1939)

In a previous paper (Tanabe, 1938) it was suggested that sublingual mucin is identical with the submaxillary. The writer collated his own analytical figures on the former with those obtained by Blix on the latter by means of different methods. In order to establish the identity more exactly, the writer prepared and investigated the submaxillary mucin, employing thoroughly the procedures which had been used for the sublingual. The figures obtained, to be given in this account, will demonstrate that the substances from both sources resemble each other well within the discrepancy which is allowed for such kinds of preparations.

It will be seen that the connection is also the same between the mucoid specimens from these glands.¹⁾

As regards the data on the sublingual mucin and mucoid, see the publications enumerated in the bibliography.

EXPERIMENTAL.

Preparation.

Submaxillary mucin and mucoid were isolated and purified as were the sublingual. 17 gm. of mucin and 0.7 gm. of mucoid were obtained on the average from 1 kilogram of the tissue.

Qualitative assays.

The results of protein tests on the preparations were exactly similar to the corresponding glycoproteins from the sublingual

gland. Phosphorus was not detected. In both the mucin and mucoid, the aniline acetate and naphthoresorcinol tests suggested the presence of uronic acid, although not distinctly. They produced a red colour with Ehrlich's reagent, not only when the alkaline solution had been heated previously but also when not heated (Blix's test).

Quantitative analyses.

The quantitative data are listed in Table I.

TABLE I.
Analyses of submaxillary mucin and mucoid.
Figures express the contents in per cent.

Analyses	Mucin			Mucoid	
	Prep. I	Prep. II	Prep. III	Prep. I	Prep. II
Nitrogen	12.8	12.6	12.7	11.3	10.2
Total reduction, after acid hydrolysis ¹⁾ , as glucose	17.6	17.1	17.4	22.2	24.3
Carbohydrate reduction, as glucose					
i) without previous alkaline treatment	13.2	12.5	12.9	17.4	19.1
ii) with previous alkaline treatment	16.1	16.0	15.7		
Glucosamine ²⁾	13.1	12.9	13.1	19.5	20.8
Glucuronic acid, by the furfural method	3.9	4.8	4.7	5.4	6.5
Ordinary sugar as glucose	2.5 ³⁾ (2.1-2.7)	2.6 ³⁾ (2.2-3.0)	2.7 ³⁾ (2.4-3.2)		
as galactose				4.4	4.3
CH ₃ CO	6.6	7.0	7.0	8.9	9.2
Sulfate-S	0.01	0.01	0.02	0.06	0.07
Ash	0.28	0.28	0.32	2.9	2.1

1) The duration of acid hydrolysis: 3 hours.

2) The numbers, 10.3, 10.6 and 10.5, which expressed the glucosamine contents in per cent of the preparations of sublingual mucin in the 33rd paper of this series of investigation, were errors in manuscript for 12.3, 12.6 and 12.5.

3) Average values of the three colorimetric reactions (the second procedures of the Masamune-Tanabe method). The figures in parentheses show the maximal (the values by the orcinol reaction) and the minimal (the values by the indole reaction) values.

The mucin (Prep. I) and mucoid (Prep. II) reduced, as such, ferricyanide to the extent of 9.9%¹⁾ and 18.1% each of glucose.

By the fractionation method of Masamune and Tanabe (the second procedure), the ordinary sugar of the mucoid was shown to be galactose; whereas, in the mucin, more than one ordinary sugar was shown to exist, because the colour intensities by the three reactions were not in accord with one another, when expressed as any of the hexoses.

Typical examples will be given below.

a) The mucin.

Prep. III was adapted. The final solution corresponded to 0.49% solution of the mucin.

Reaction	Colorimetric reading mm	Conc. (%) of the ordinary sugar in the final solution, expressed as:		
		Galactose	Mannose	Glucose
Orcinol	15.1	0.0118	0.0120	0.0155
Indole	17.3	0.0150	0.0168	0.0118
Diphenylamine I.	15.4	0.0215	0.0108	0.0123

b) The mucoid.

Prep. II was taken. 1 cc. of the final solution corresponded to 5.4 mg of the preparation.

Reaction	Colorimetric reading mm	Conc. (%) of the ordinary sugar in the final solution, expressed as:		
		Galactose	Mannose	Glucose
Orcinol	8.4	0.0233	0.0250	0.0358
Indole	12.4	0.0225	0.0245	0.0165
Diphenylamine I.	14.0	0.0235	0.0135	0.0115

1) Reduction by a specimen of sublingual mucin was equivalent to 9.3% of glucose.

*Physical measurements.**The mucin.*

The substance (Prep. II) was dissolved in water by means of the least requisite quantity of dilute NaOH solution. pH of the solution thus prepared was 8.35 and concentration 1.0275%.

i) Optical rotation

$$[\alpha]_D^{23} = \frac{-0.22 \times 100}{1.0021 \times 1.0275 \times 1} = -21.4^\circ$$

ii) Specific refraction

$$\frac{(1.33475)^2 - 1}{(1.33475)^2 + 2} \cdot \frac{1}{0.9994} \cdot \frac{100}{1.0275} - \frac{(1.33268)^2 - 1}{(1.33268)^2 + 2} \cdot \frac{1}{0.9973} \cdot \frac{100 - 1.0275}{1.0275} = 0.276^\circ$$

The mucoid.

Prep. II was adapted as watery solution.

i) Optical rotation

Cone. of the mucoid in the solution was 1.013%.

$$[\alpha]_D^{18} = \frac{-0.13 \times 100}{1.0063 \times 1.013 \times 1} = -12.8^\circ$$

ii) Specific refraction

Cone. of the mucoid in the solution 1.0%.

Temp. was 12°C.

$$\frac{(1.33467)^2 - 1}{(1.33467)^2 + 2} \cdot \frac{1}{1.0038} \cdot \frac{100}{1.0} - \frac{(1.33315)^2 - 1}{(1.33315)^2 + 2} \cdot \frac{1}{0.9995} \cdot \frac{100 - 1.0}{1.0} = 0.203^\circ$$

The writer is much indebted to the Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant.

REFERENCES.

- Tanabe, Y. (1938): Journ. of Biochem., **28**, 227.
 Tanabe, Y. (1939, i): Journ. of Biochem. **29**, 387.
 Tanabe, Y. (1939, ii): Journ. of Biochem. **29**, 439.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

L. Prosthetic Group of Corneamucoid.

By

MASAMI SUZUKI.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, February 13, 1939)

Levene and López-Suárez¹⁾ placed the carbohydrate grouping of corneamucoid together with those of funis and vitreous mucins under a subgroup of mucitinsulfuric acids in their classification; while Karlberg recently claimed it to be a polysaccharide made up of glucosamine and a kind of hexose, probably mannose, in the proportion of 1 to 1. He based his conclusions on analyses of his mucoid preparations, which contained 7.7% glucosamine and 8.0% "mannose", with only 0.3% S separable by hydrolysis.

Intending to clarify this problem, I at first prepared the mucoid in a like manner to Mörner, but started with tissue which had been first dried with alcohol, and made analyses according to the procedures of our laboratory. The results affirmed neither of the foregoing assertions as the preparations involved glucosamine and galactose in one equivalent ratio; and moreover, sulfate-S in the same ratio, whereas glucuronic acid was not found. Sulfur in the form of sulfate was said by Karlberg to have amounted only to 0.22 equivalent of glucosamine in his preparation. According to our experience, however, this inorganic radical, when combined with sugar, is cleft off with comparative difficulty, as already mentioned²⁾ and in addition at least 6 hours are required for the complete precipitation of BaSO₄. It is suspected accordingly, that Karlberg as well as Mörner who insisted on the complete absence

1) They isolated carbohydrate complexes directly from tissues not only from cornea but also from other kinds of animal material, throughout the whole of similar investigations.

2) The 31st communication.

of sulfate-S, may have not amplified these analytical conditions. In the second undertaking, I tried to isolate the carbohydrate complex from the mucoid by following the procedures of Levene and López-Suárez. Although the preparations obtained were not sufficiently pure, the constituents of the complex remained in them in the same proportions as in the mucoid. The equivalent ratios of nitrogen to sulfate-S were 2.76 and 3.42, resembling the corresponding relations in the specimens which Levene and López-Suárez assumed as mucoitinsulfuric acid without deciding if uronic acid, a characteristic constituent of itinsulfuric acid, were involved. These authors attributed the relative low content of sulfur to its instability in linking to the carbohydrate. The nitrogen values in their substances, on the contrary, seem to me too high, owing to the impurities containing this element.

It is interesting that the hexosamine-hexose complex which is free from glucuronic acid exists in some glycoproteins as an etherial sulfate similarly as has been well established in chondroitin and mucoitin.

Meyer and Palmer appended to one of their communications on glycoproteins a note saying that they could isolate from cornea a substance having the composition of mucoitin sulfuric acid. The details have not yet been published.

EXPERIMENTAL.

Preparation.

I. Mucoid.

The corneas (of cows' eyes) were removed from the sclera, and the *substantia propria* was separated from the epithelial layer and from Descemet's membrane mechanically, and then dehydrated by placing in 95% alcohol for several days. From 1440 corneas were thus obtained 90 gm. of dry discs.

The dry discs were sheared with scissors, and, after the addition of a thymol alcoholic solution, agitated in cold water¹⁾ (1300 cc.

1) Mörner employed potassium hydroxide solution and ammonical water besides water alone.

for 10 gm. of the material) with a stirrer for 5 days. The residue was extracted again for 3 days, by renewing the water; and to the combined extracts, which reacted neutrally, were added 30% acetic acid until the pH was lowered to 1.6. The deposits which appeared thereby were suspended in water (200 cc. when preparation was begun with 10 gm. of the material), dissolved by means of a dilute K_2CO_3 solution, the pH being maintained within 8.0, and reprecipitated with acetic acid, after centrifuging off the insoluble part. Purification was repeated once more in a like manner, but this time, alkali was not required for dissolution. The substance was then washed with alcohol and ether and finally dried in vacuo over P_2O_5 . The yield of Prep. I (from 10 gm. of dry material) was 150 mg and that of Prep. II (material: 31 gm.) was 0.6 gm. To add an explanatory remark, the mucoid formed no slimy solutions in water and was precipitated always in the form of flock, as Mörner observed. Precipitation occurred more easily in the presence than in the absence of sodium chloride, which is just the reverse of the case of funis mucin.

II. *The carbohydrate grouping.*

Separation was carried out on the principle which Levene and López-Suárez adapted for isolating it from tissue, except that in the final stage the product was treated further with chloroform and amylalcohol, as follows:

300 mg of the mucoid were taken up in 20 cc. of 1.5% NaOH solution and stood at room temperature. After 3 days, the solution was acidulated with 30% acetic acid and heated with an excess of $BaCO_3$ powder on a bath for 2 days, with occasional agitation. Water was added from time to time, and it was finally centrifuged. The substance in view was then precipitated from the supernatant brownish liquid with 30 volumes of glacial acetic acid. The deposit was washed 10 times with alcohol, kneaded with 3 cc. of chloroform for 2 hours, and thereupon 15 cc. of water and 1 cc. of amylalcohol were further added, followed by shaking for 12 hours. After centrifuging the mixture, the substance was precipitated from the watery layer, as mentioned above, with glacial acetic acid, washed

with alcohol and ether and dried in vacuo (Prep. I). A crop of 40 mg was obtained.

Prep. II was prepared from 0.5 gm. of the mucoid and the yield amounted to 50 mg.

Qualitative Tests.

I. The mucoid.

Biuret, xanthoprotein, Millon, Sakaguchi, diazo and Molisch (deep reddish-violet coloration) tests were all positive. Hopkins-Cole and Morse reactions were negative.

It was precipitated faintly by ammonium sulfate (at half saturation), mercuric acetate, mercuric chloride and tannic acid and markedly by phosphotungstic acid and trichloroacetic acid, while not by ferricyanide-acetic acid. Heat coagulation did not take place.

It was free from phosphorus. Although in a slight degree, Blix's test for amino-sugar was given immediately without previous heating of its alkaline solution. Naphthoresorcinol and aniline acetate tests for uronic acid were negative.

II. The specimens of the carbohydrate grouping.

Biuret was given. The Molisch test gave a reddish violet colour. Naphthoresorcinol and aniline acetate tests were negative.

Quantitative Analyses.

Analytical data of the mucoid will be listed in Table I.

In these specimens less nitrogen was contained than in Mörner's (12.63–12.97%) as well as in Oldfeldt's (13.0–13.8%). For preparation, the tissue was treated here in advance with alcohol, as in the case of funis mucin.¹⁾ Therefore, for the same reason as stressed there, the present specimens are considered purer than those of the previous authors. Correspondingly, with respect to the carbohydrate content, these specimens surpassed conspicuously Karlberg's, which like those of Mörner and of Oldfeldt,

1) The 46th paper of this series of investigation (Suzuki, 1939).

TABLE I.
Analyses of corneamucoid.

Analyses	In per cent		Expressed as equivalents per equivalent weight	
	Prep. I	Prep. II	Prep. I	Prep. II
Nitrogen	11.39	11.70		
Total reduction ¹⁾ , as glucose	38.23	37.57		
Carbohydrate reduction ¹⁾ , as glucose	24.12	24.03		
Glucosamine	12.88	12.26	1.00	1.00
Galactose				
i Diphenylamine method I	12.86	12.76		
ii Indole method	12.74	12.89		
iii Orcinol method	12.86	12.89		
mean	12.82	12.85	0.99	1.04
Acetyl	3.28	3.04	1.06	1.03
Sulfate-S	1.87	1.99	0.81	0.91
Ash	3.49	3.42		

1) Duration of acid hydrolysis: 3 hours.

had been separated from fresh tissue.

The ordinary sugar was identified with galactose colorimetrically by the method repeatedly employed means in this laboratory. When expressed as mannose or glucose, the figures calculated from the intensities of coloration were not coincident. Next, in each of the preparations the carbohydrate reduction was in fair agreement with the total sum of the reducing forces calculated from galactose and glucosamine contents. The latter were in Prep. I, 24.08¹⁾ and in Prep. II, 23.44%¹⁾ as glucose. These findings and the negative result of naphthoresorcinol test all deny the existence of uronic acid.

Finally the amino-sugar, galactose and acetyl were found to be

$$1) \quad 12.82 \times \frac{500}{614} + 12.88 \times \frac{650}{614} = 24.08 \quad \text{and} \quad 12.85 \times \frac{500}{614} + 12.26 \times \frac{650}{614} = 23.44$$

The relative reducing forces of galactose and glucosamine to glucose were derived from the experimental values of Masamune and Tanabe (1938).

present in an unequivalent proportion. Sulfate-S amounted to a little less than the equivalent, but the divergencies were within analytical error.

Conclusively it may be said that the prosthetic group of the cornea mucoid is taken up by a sulfuric ester of an equimolecular complex of acetylglucosamine and galactose.

Analyses of the preparations of the carbohydrate complex gave figures embodied in Table II.

TABLE II.
Analyses of preparations of the carbohydrate grouping.

Analyses	In per cent		In equivalents per equivalent weight	
	Prep. I	Prep. II	Prep. I	Prep. II
Nitrogen	5.71	5.90	2.76	3.42
Total reduction ¹⁾ , as glucose	52.50	47.22		
Carbohydrate reduction ¹⁾ , as glucose	48.14	43.75		
Glucosamine		22.05		1.00
Galactose				
i Diphenylamine method I	26.60	21.96		
ii Indole method	26.60	21.96		
iii Orcinol method	26.83	22.22		
mean	26.68	22.05	1.00	1.00
Acetyl		6.04		1.14
Sulfate-S	4.42	3.61	0.93	0.92
Ash		10.91		

Levene and López-Suárez's preparations: 3.93% N and 2.27% sulfate-S (equivalent ratio of N to S: 3.96 to 1.00), and 4.62% N and 3.10% sulfate-S (equivalent ratio of N to S: 4.76 to 1.00).

1) Duration of hydrolysis: 3 hours.

The products still showed positive biuret reaction, owing to the insufficient strength of the alkali which was employed for cleaving off the protein part. The lack of material did not allow a further attempt with stronger alkali. Nevertheless, it is worth

noting that the mutual relationships among the components of the assumed carbohydrates remained so by the alkaline treatment, notwithstanding the marked reduction of nitrogen belonging to the protein fragment. The mutual relations among them would have been altered, if the carbohydrate grouping had not been made up of a single polysaccharide.

I also attempted to isolate the carbohydrate complex directly from the tissue as did Levene and López-Suárez. But the product appeared to involve more than one ordinary sugar because the reactions by means of orcinol, indole and diphenylamine gave colours of intensities which did not agree with one another, when expressed as any of the hexoses.

The Foundation for the Promotion of Science and Industrial Research of Japan gave a grant towards the cost of this research, which is gratefully acknowledged.

REFERENCES.

- Karlberg, O. (1936): Hoppe-Seyler's Zeits. f. Physiol. Chem., **240**, 55.
Levene, P. A. and López-Suárez, J. (1918): Journ. of Biol. Chem., **36**, 105.
Meyer, K. and Palmer, J. W. (1936): Journ. of Biol. Chem., **114**, 689.
Mörner, C. Th. (1894): Hoppe-Seyler's Zeits. f. Physiol. Chem., **18**, 213.
Oldfeldt, Carl-Olof (1936): Hoppe-Seyler's Zeits. f. Physiol. Chem., **240**, 249.



BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

LI. Carbohydrate Grouping of the Mucin from the Vitreous Humor.

By

MASAMI SUZUKI.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, February 13, 1939)

As is customary in this laboratory, an investigation of this subject was also made, first on the mucin and then on the carbohydrate separated from it. Levene and Meyer tried with their co-workers to isolate the latter directly from the humor. But first, polysaccharides in animal tissues, other than glycogen, are not all regarded as conjugated with proteins,¹⁾ and second, in some of the glycoproteins more than one kind of carbohydrate¹⁾ are involved. Consequently neither of the substances obtained by the authors mentioned above is assumed to be the prosthetic group in search or, if it be so, to take up alone the whole of this part.

The mucin is scarcely precipitated from the fresh humor by simple acidification. Therefore, Mörner²⁾ diluted the humor 2 to 6 times before treatment with acetic acid, while Young²⁾ criticized the dilution as of little effect³⁾ and recommended either to use liquor 3 or 4 days old or to boil it, while fresh, in order to change the "acid-soluble mucinogen" into mucin. The writer found it easily separable if one collects the alcohol-precipitable substances from the vitreous humor and acidulates the watery extract. The

1) The readers are referred to the 37th, 39th, 43rd and 47th communications of this series of investigation (Hisamura 1938 i and ii, Tanabe 1939, and Suzuki 1939 ii).

2) Literature before Mörner and Young was reviewed comprehensively by these authors.

3) The writer substantiated what he said.

preliminary alcoholic treatment not only removes mineral salts which hinder the mucin from precipitation by acid, but also denatures or makes insoluble the proteins which act as protective colloids.

Preparations obtained by the new process contained less nitrogen than those of Mörner and of Oldfeldt. The purity of the preparations seemed the same as in the cases of funis mucin and corneamucoid (Suzuki 1939 i and iii). The relationships among carbohydrate-reduction, glucosamine, glucuronic acid and acetyl were like those in funis mucin. Sulfate-S was either absent completely or so scanty that it was an impurity. No ordinary sugar was found. The results suggested that mucoitin from funis mucin constitutes the sole ingredient of the prosthetic group. The preparation showed a neutral equivalent and optical rotation identical to those of the carbohydrate from funis mucin (Suzuki 1938). Regarding the prosthetic group of this mucin, the writer could not agree with Karlberg who thought it composed of glucosamine and "mannose".

EXPERIMENTAL.

Preparation.

I. The mucin from vitreous humor.

The vitreous humor was dissected out from fresh ox eyes and added to 5 volumes of alcohol (95%), after being filtered through a cotton gauze. The deposit was separated, washed with alcohol and ether and dried in vacuo at room temperature. 30 mg of dry powder were obtained, on the average, from one eye. In the next stage, the material was submitted to extraction by placing in cold water (300 cc. of water when 2 gm. of the powder were used) in an ice chest over night. The residue was extracted twice more with decreasing volumes of water (200 and 100 cc. in the example). The extracts were combined and filtered through a Büchner funnel, and the viscid filtrate was acidified by means of 30% acetic acid to pH 2.0 in order to precipitate out the mucin. It was not soluble in an excess of acetic acid, while the addition of sodium

chloride was seen to interfere with it in falling out. The crude product was further taken up in water and dissolved by means of the least requisite quantity of dilute K_2CO_3 solution¹⁾ and deposited again with acetic acid. The substance was redissolved and reprecipitated, finally washed with alcohol and ether and dried in vacuo over P_2O_5 .

Specimen I: Started with 2 gm. of the dry powder. The combined extracts reacted feebly alkaline (pH 7.6). Yield, 400 mg.

Specimen II: 4 gm. of the dry material was used. Care was taken to keep the extracting water neutral by the occasional addition of dilute acetic acid. Yield, 800 mg.

Specimens III and IV: Prepared as was Sp. I. The materials employed were 5 gm. and 1 gm. and the yields were 1.0 and 2.0 gm. respectively.

All of these preparations formed viscous solutions when dissolved in water with the aid of an alkali.

II. The carbohydrate grouping.

The procedures adopted to separate mucioitin from funis mucin were employed and a product weighing 70 mg was obtained from 200 mg of Sp. II of the mucin.

Qualitative Tests.

I. Mucin.

It gave positive biuret, xanthoprotein, Millon, Sakaguchi and diazo (orange red) tests. Hopkins-Cole and Morse tests were negative. All the specimens gave by the Molisch reagents the green coloration characteristic of uronic acid, but Sp. I, III and IV, in preparation of which the watery extracts became a little alkaline, showed a reddish layer besides the green stratum; although the ordinary sugar contaminants could be only very small, when judged from the results of orcinol and indole reactions (see below).

Ammonium sulfate (at half saturation) and mercuric chloride

1) pH was not shifted beyond 8.0.

produced turbidity, while mercuric acetate, phosphotungstic acid, trichloroacetic acid and tannic acid precipitated it well. Potassium ferricyanide (+acetic acid) did not cause any precipitation at all. Heat coagulation was not producible.

Phosphorus was absent.

Naphthoresorcinol (Néuberg and Saneyoshi) and aniline acetate tests were given.

Blix's test for aminosugar was shown immediately without previous heating of alkaline solution of the substance.

Quantitative Estimations.

The data on mucin will be embodied in Table I and those on the carbohydrate grouping in Table II.

TABLE I.
Mucin from the vitreous humor.

Analyses	In per cent				In equivalents per equivalent weight			
	Sp. I	Sp. II	Sp. III	Sp. IV	Sp. I	Sp. II	Sp. III	Sp. IV
Nitrogen ¹⁾	10.09	10.04	9.68	10.03				
Total reduction ²⁾ , as glucose	41.66	43.57	45.16	42.99				
Carbohydrate reduction ²⁾ , as glucose	34.09	34.40	34.52	33.80				
Glucosamine	22.71	21.58	22.60	22.91	1.00	1.00	1.00	1.00
Glucuronic acid								
i Furfural method	24.27	23.11	24.34	24.27				
ii Indole method	25.31	24.55	24.00	25.66				
iii Orcinol method	24.68	24.01	24.09	25.78				
(mean)	24.75	23.89	24.14	25.24	1.00	1.02	0.98	1.02
Acetyl	5.06	5.47	5.94	5.25	0.93	1.06	1.09	0.95
Sulfate-S	0.16	0.26	0.24	0.0	0.03	0.07	0.05	0.0
Ash	0.69	0.49	0.50					

1) Mörner: average 12.27%; Oldfeld: 12.7 and 12.8%.

2) Time of hydrolysis: 3 hours.

It would be superfluous to comment on the figures, because a glance shows that the carbohydrate has the composition of

TABLE II.
Mucotin from mucin of the vitreous humor.

Analyses	In per cent	In equivalents per equivalent weight
Nitrogen	3.16	0.96
Reducing force after hydrolysis ^b , as glucose	64.70	
Glucosamine	42.20	1.00
Glucuronic acid		
i Furfural method	47.51	
ii Indole method	47.78	
iii Orcinol method	49.10	
mean	48.16	1.05
Acetyl	10.16	1.00
Sulfate-S	0.0	
Ash	0.15	

1) Time of hydrolysis: 3 hours.

mucotin that Levene proposed. Its neutral equivalent and optical rotation were the following.

Neutral equivalent.

$$\frac{0.002511 \times 1000}{\frac{0.65}{100}} = 386.$$

Optical rotation.

$$[\alpha]_D^{15} = \frac{0.055 \times 3.3078}{0.00251 \times 1.0008} = -72.4^\circ$$

This work was supported by a grant from the Foundation for the Promotion of Science and Industrial Research of Japan.

REFERENCES.

- Hisamura, H. (1938, i): Journ. of Biochem., **28**, 217.
 Hisamura, H. (1938, ii): Journ. of Biochem., **28**, 473.
 Karlberg, O. (1936): Zeits. f. Physiol. Chem., **240**, 55.
 Levene, P. A. and López-Suárez (1918): Journ. of Biol. Chem., **36**, 105.
 Meyer, K. and Palmer, J. W. (1934): Journ. of Biol. Chem., **107**, 629.
 Meyer, K. and Palmer, J. W. (1936): Journ. of Biol. Chem., **114**, 689.

- Mörner, C. Th. (1893): Zeits. f. Physiol. Chem., **18**, 245.
Oldfeldt, Carl-Olof (1936): Zeits. f. Physiol. Chem., **240**, 249.
Suzuki, M. (1938): Journ. of Biochem., **28**, 479.
Suzuki, M. (1939 i): Journ. of Biochem., **29**, 447.
Suzuki, M. (1939 ii): Journ. of Biochem., **29**, 453.
Suzuki, M. (1939 iii): Journ. of Biochem., **30**, 185.
Tanabe, Y. (1939): Journ. of Biochem., **29**, 379.
Young, R. A. (1894): Journ. of Physiol., **41**, 325.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

LII. Estimation of Free Aminosugar¹⁾ in Urines, Normal and Diabetic.

By

MASATO YOSITAKE.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, February 13, 1939)

The Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for the estimation of glucosamine was improved in accuracy by Watanabe. But the disagreeable feature found in the evaporation of a glucosamine containing solution still remained, because a faint browning of the residue always takes place, when the method is applied, as Kawabe did, to urine analysis, and interferes with the final stage of colorimetry. This difficulty is avoided if one replaces acetylanhydride with acetylacetone as the reagent to derive a product giving a dyestuff with Ehrlich's reagent. It was for a similar reason that Masamune and Nagazumi applied the principle of Elson and Morgan to the analysis of glycoproteins.

Non-amino-sugars in protein molecules have an inhibitory action on the colour development of the aminosugar. So Masamune and Nagazumi disintegrated them by heating the proteins with 5.5*n* hydrochloric acid for a long time. In order to analyse diabetic urine, urea as well as glucose must be removed or decomposed at first, because it is also an extreme depressor of the coloration of the aminosugar, as Kawabe mentioned. In an effort to devise a convenient method for this purpose, the writer found that, under the conditions preferred, hot hydrochloric acid breaks

1) No free aminosugar is found normally in urine. The object of the present analysis is the aminosugar excreted as such after its administration to the animal body.

up both glucose and urea to satisfactory extent, while glucosamine remains wholly in a perfect state. In urine, glucosamine is pre-existent as combined in a glycoprotein as well as in polysaccharides and is set free by this acid treatment. But these colloidal substances remained on an ultrafilter and it was thus possible to estimate quantitatively free glucosamine in normal and diabetic urines, which will be discussed in the following.

REAGENTS AND APPARATUS

1. Acetic acid solution (30%).
2. Lead acetate solution (neutral, 37.9%).
3. Ether purified and saturated with water.
4. HCl solution (2*n*).
5. Anhydrous Na_2CO_3 powder.
6. Reagents by Masamune and Nagazumi for analysis of the aminosugar of proteins.¹⁾

In the acetylacetone solution are dissolved 2.923 gm. of NaCl per 15 cc.

7. Membrane for ultrafiltration.

A hard filter paper ($5\frac{1}{2}$ cm, Toyo Roshi Co.) is soaked with pharmaceutical collodion solution (4%) and suspended in air for 5 minutes for drying. The impregnation and the following suspension are repeated once more and the membrane is submerged and kept in distilled water for use.

8. An Zsigmondy apparatus for filtration.

PROCEDURES.

When the urine is alkaline, it is acidified to pH 6.8 by means of 30% acetic acid.

20 cc. of urine is mixed with 4 cc. of the lead acetate solution, precipitates are centrifuged off and the excess of lead is removed by means of H_2S -gas. After aerating out H_2S , the liquid is filtered through a membrane, (7) in the above, clamped in a Zsigmondy

1) S. p. 224-225 in their communication.

apparatus and the filtrate is passed through with a rapid current of ether for 1.5 hours. Ether is expelled. The pH of the solution is about 6.4 at this stage. 6 cc. of it are then taken into a test tube¹⁾ and autoclaved with 4 cc. of 2*n.* HCl solution at 150°C for 10 minutes.²⁾ When cold, the contents of the tube are neutralized with anhydrous sodium carbonate powder to pH 6.8, with a following transference into a 25 cc. measuring flask with the lead acetate solution, as described by Masamune and Nagazumi, and the procedures of these authors are further followed.

CALCULATION.

Calculation is made after Masamune and Nagazumi, the successive dilutions of the urine being taken into account.

REMARKS AND EXPERIMENTS.

1. When urea is introduced simultaneously with the aminosugar as a watery solution into the aminosugar tube³⁾ of Masamune and Nagazumi, it does not hinder the colour reaction up to 4 mg, whereas 8 mg change the colour to orange red from violet red and makes colorimetry impossible.

The quantity of hydrochloric acid which is necessary for disintegrating urea was determined by autoclaving 5 cc. of an acidulated rabbit urine at 150°C for 10 minutes with 5 cc. of this acid at various strengths (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 and 2*n.*). The solution was cooled, 10 mg of glucosamine hydrochloride added and treated further as described above. The results demonstrated that, when the acid was 1.2*n.* or stronger, the colour developed was of the same nuance as the standard and the colorimetric reading coincided exactly with calculations from the quantities of the added glucosamine and of the pre-existent one⁴⁾ which was estimated

1) 2.5 cm × 18 cm. It is covered with tinfoil and set in the autoclave.

2) It takes 30 minutes each to raise the temperature to 150°C and to let it fall back to 100°C.

3) Signifies the tube employed for condensation of the aminosugar with acetylacetone and following coloration.

4) Most of normal rabbit urines contain more than 100 mg of glucosamine in combined form per 100 cc. as expressed as the hydrochloride.

similarly without addition to the urine of the aminosugar.

Regarding the decomposition of non-amino-sugars, experiments were carried out in a like manner by taking, instead of urea, 50 mg each of glucose, mannose, fructose and galactose. In all cases the sugars were decomposed so extensively that no more depression of the coloration of the aminosugar was observed.

2. Recovery of added glucosamine. Various amounts of glucosamine hydrochloride were dissolved in human as well as in rabbit urine, which had been neutralized by means of acetic acid and clarified by centrifuging, and subjected to the present procedures of analysis. The recovery was complete. A red colour was also developed by the urine to which no aminosugar was added, but it was infinitesimally pale and had no perceptible influence on the results, as can be readily seen from the figures listed in Table I.

TABLE I.
Recovery of glucosamine added.

Glucosamine hydrochloride added to 100 cc. of urine mg	Recovery of glucosamine			
	Rabbit urine		Human urine	
	mg in 100 cc. of urine, as hydrochloride	% of recovery	mg in 100 cc. of urine, as hydrochloride	% of recovery
125	122.5	98	127.5	102
250	250	100	250	100
375	375	100	375	100

3. When urine which had been acidified to pH 4.6 was shaken with chloroform for 24 hours, most of the aminosugar-containing compounds were found to have been removed. This treatment, however, was not so advantageous as ultrafiltration.

4. Calcium in urine is not removed by the preparatory operations for the coloration process, and it accordingly precipitates out a part of the carbonate of the acetylacetone solution, but the deposit disappears again on treatment with Ehrlich's reagent, producing no effect on the colour development.

5. Hippuric acid, uric acid and creatinine gave no product by the autoclaving, which gives colored derivatives with acetyl-acetone and Ehrlich's reagent.

I am indebted to the Foundation for the Promotion of Science and Industrial Research of Japan for a grant towards the expenses of this work.

REFERENCES.

- Kawabe, K. (1934): *Journ. of Biochem.*, **19**, 319.
Masamune, H. und Nagazumi, Y. (1937): *Journ. of Biochem.*, **26**, 223.
Watanabe, K. (1936): *Journ. of Biochem.*, **23**, 365.

EINE MIKROBESTIMMUNGSMETHODE DES HISTIDINS.

VON

ZENYA KURIHARA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 24. März 1939)

Die Mikrobestimmung des Histidins beruht auf der Pauly-schen Diazoreaktion oder der Knoopschen Bromreaktion. Die erste Reaktion wurde besonders wegen ihrer ausserordentlich grossen Empfindlichkeit zur quantitativen Histidinanalyse herangezogen, sie hat aber an sich den Nachteil, dass die Färbung mit dem Diazoreagens nicht spezifisch ist. Die letztere Reaktion ist dagegen, wie von Knoop (1908) betont wurde, für Histidin spezifisch. Sie wurde von Kapeller-Adler (1934 a) zur Mikromethode der Histidinbestimmung ausgearbeitet.

Die Knoopsche Reaktion verläuft wie folgt. Wenn man eine wässrige Lösung des Histidins oder seiner Salze mit Bromwasser bis zum Bestehenbleiben eines gelblichen Tons versetzt und erhitzt, wird die Lösung zuerst farblos, dann färbt sie sich aber bald rot oder weinrot. Die Farbreaktion kann auch in der Kälte stattfinden, jedoch langsamer als in der Hitze. Hunter (1922) hat angegeben, dass das Histidin bei Zimmertemperatur pro ein Mol mit 3 Atom Brom reagiert und bei der Ausführung der Knoopschen Reaktion in der Hitze eine vorherige Entfernung des überschüssigen Broms durch Chloroformextraktion vorteilhaft ist. Wie später erwähnt, habe auch ich einen grossen Überschuss von Brom auf Histidin in saurer Reaktion einwirken lassen und nach 10 Minuten das Brom mit Chloroform ausgezogen. Eine merkwürdige Angabe von Hunter ist nun, dass die Farbnuance der Histidinbromreaktion von der Azidität der Lösung abhängig ist. Bei stark saurer Reaktion wird nämlich eine gelblichbraune, bei neutraler Reaktion aber eine dunkelbraune Ver-

färbung beobachtet. Falls die Histidinbromlösung jedoch vor der Erhitzung mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht wird, entsteht eine unbeständige hellrote Farbe. Wenn die Lösung dagegen mit Ammoniak alkalisiert wird, ist eine schnelle Entwicklung einer tiefen violetten Farbe zu beobachten. Die optimale Ammoniakmenge zur Farbreaktion war aber nach jenem Autor schwer zu ermitteln.

Als Kapeller-Adler (1934 a) zuerst über ihre Methodik berichtete, hat sie sich wohl prinzipiell die Tatsache zunutze gemacht, dass der schwarze flockige Körper, der sich bei der Knoopschen Reaktion aus der Histidinbromlösung in der Wärme niederschlägt, durch Ammoniak bzw. Ammoniumcarbonat in eine purpurrote bzw. tiefblauviolette Lösung überführbar ist, jedoch hat sie in der praktischen Ausführung, zufällig mit der Angabe von Hunter (1922) übereinstimmend, aber ohne vorherige Entfernung des Bromüberschusses die Histidinbromlösung einfach nach dem Zusatz der Ammoniak-ammoniumcarbonatlösung erhitzt.

Nach meiner Erfahrung bei Histidinstudien muss 1) die Histidinlösung nach der Reaktion mit überschüssigem Brom von freiem Brom befreit werden, 2) muss die Azidität der Histidinbromlösung während der Entwicklung der Farbe konstant gehalten werden. In bezug auf den ersten Punkt ziehe ich die Entfernung des Broms durch Chloroformbehandlung vor, obwohl Kapeller-Adler (1934 b) bzw. Földes (1936) einen vorsichtigen Zusatz von Essig-Bromlösung unter Verwendung von Jodkalistärkepapier bzw. einer entsprechenden Lösung empfohlen haben. Sera (1936) hat das überschüssige Brom mittels Ammoniumrhodanids reduziert. Hinsichtlich des zweiten Punktes hat schon Hunter, wie oben erwähnt, die Abhängigkeit des Farbtons von der Azidität der zu erhitzenden Lösung mitgeteilt. Sera (1936) hat $\text{pH } 5$ als die günstigste Azidität für die Farbenentwicklung gewählt. Dies ist eine beachtenswerte Feststellung von Sera. Er hat ausserdem die Histidinbromlösung nur auf 50° erwärmt. Die meisten Autoren, die sich bisher mit der Knoopschen Reaktion beschäftigten, haben die Histidinbromlösung erhitzt oder

genauer gesprochen, im Becherglas mit siedendem Wasser erhitzt. Bei solcher hohen Temperatur ist aber im allgemeinen der Verlauf der Farbstoffbildung und der Nuanceänderung so schnell, dass man an den gleichzeitig angestellten Proben manchmal kaum gleichmässige Erhitzung erwarten kann. Wie später erwähnt, habe ich die Verfärbung der Histidinbromlösung bei Zimmertemperatur ablaufen lassen.

Die Histidinreaktion von Kapeller-Adler (1934 b, c; 1936), Weiss (1934) und Földes (1936) wurde eigentlich für die Schwangerschaftsdiagnose zu einer direkt am Urin ausführbaren Form ausgearbeitet, die Farbintensität braucht daher nicht dem Histidingehalt proportional sein. Die ursprüngliche Methode von Kapeller-Adler (1934 a) hat aber die quantitative Histidinbestimmung bezweckt und war wirklich an Eiweisshydrolysaten und Urin ausführbar. Dabei wurde das daraus isolierte Histidin in 10% Schwefelsäure gelöst und diese Lösung in gleicher Weise wie die Standardhistidinlösung, die in 0.2% Schwefelsäure gelöst war, behandelt. Meines Erachtens wird eine gleiche Menge Histidin in 0.2% bzw. 10% Schwefelsäure nach sofortigem Bromieren und Alkalisieren einen stark voneinander abweichenden Farbgrad zeigen.

Ich habe unter der Leitung von Prof. Akamatsu über die Mikrobestimmung des Histidins gearbeitet. Sie wird zukünftige Studien über den Histidinumsatz fördern.

Die kolorimetrische Histidinbestimmung soll auf einer spezifischen Reaktion dieser Aminosäure beruhen. Ich bin daher von der Knoopschen Reaktion ausgegangen. Die Methodik soll weiter—so hoffte ich—an der einfachen enteweissten Lösung ohne vorherige Isolierung des Histidins oder seiner Fraktion ausgeführt werden, soweit die Lösung ausser dem Histidin keine chromogene Substanz und keine, die Kolorimetrie störende Substanz enthält. Ich habe daher unter der Voraussetzung, dass die Ente Weissung durch Zusatz des gleichen Volumens 16%iger Trichloressigsäure ausgeführt wird, die kolorimetrische Bestimmung an der Histidinlösung, die mit Trichloressigsäure in gleicher Weise gemischt ist, studiert.

Die Bromierung des Histidins wird bei Zimmertemperatur mit überschüssiger Menge Brom-chloroformlösung ausgeführt, da das Histidin unter dieser Bedingung nicht zerstört wird. Das nicht reagierende Brom in der wässrigen Schicht wird durch Chloroform ausgeschüttelt. Dadurch nimmt das Histidin in der Lösung eine genügende und hinreichende Menge Brom auf. Man muss aber darauf achten, dass bei der Chloroformextraktion auch die Trichloressigsäure aus der wässrigen Lösung teilweise entfernt wird. Um den Trichloressigsäuregehalt möglichst gleichmässig zu halten, habe ich zur Entbromierung der wässrigen Schicht 8% Trichloressigsäurechloroformlösung verwandt.

Die Entwicklung einer Farbe von gleicher Nuance in der Histidinbromlösung und die Stabilisierung der Farbe war—wie bei anderen Autoren—auch bei mir eine schwierige Aufgabe. Nach zahlreichen vergeblichen Prüfungen habe ich endlich gefunden, dass zur Verfärbung der Histidinbromlösung eine Erhitzung überhaupt unterbleiben soll, weil bei erhöhter Temperatur die Farbreaktion zu schnell abläuft, um die Farbe in bestimmter Nuance zu behalten, und weiter, dass die Azidität während der Farbenentwicklung am besten bei PH 4.6 gehalten werden soll. PH 4.6 ist gerade die Azidität, bei der der Essigsäure-Acetatpuffer maximale Pufferwirkung ausübt. Man kann daher die Histidinbromlösung, die durch Trichloressigsäure schon vorher stark angesäuert ist, mit einem konzentrierten Gemisch von Essigsäure-Natriumacetat (1:1) versetzen, ich habe aber bloss aus Erfahrung ein Gemisch von Essigsäure-ammoniumacetat gebraucht. Bei PH 4.6 und bei Zimmertemperatur färbt sich die Histidinbromlösung allmählich violettrot und zeigt in 25–30 Minuten die maximale Verfärbung. Dem Essigsäure-acetatpuffer anschliessend wird gleichzeitig eine kleine Menge Kaliumcyanid zugesetzt. Das Cyanid bewirkt eigentlich, wie noch zu erwähnen, Stabilisierung der blauen Farbe bei alkalischer Reaktion. Da aber die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung bei PH 4.6 unter Umständen in unspezifischer Weise von anderen Substanzen als dem Histidin beeinflusst wird und das Cyanid diesen Einfluss ausschaltet, ist der vorherige Cyanzusatz sehr vorteilhaft.

Die violettrote Verfärbung der Histidinbromlösung bei pH 4.6 ist aber nicht histidinspezifisch. Um eine dem Histidin eigentümliche Verfärbung zu erhalten, habe ich jene 25-30 Minuten stehen gelassene Lösung mit Kalilauge deutlich alkalisch gemacht. Die violettrote Farbe schlägt in schönes Blau um. Die Alkalisierung bewirkt bloss Farbveränderung, die völlige Farbentwicklung bei pH 4.6 muss daher schon vor dem Alkalizusatz zustande gekommen sein. Zur Stabilisierung der Farbstoffdispersion wird nach Erfahrung Glycerin vor dem Kalizusatz in die Lösung gemischt. Die blaue Verfärbung der alkalisierten Lösung ist in merkwürdiger Weise gegen Luftsauerstoff empfindlich. Der oben erwähnte Cyanzusatz wirkt aber gegen die Luftoxydation des braunen Farbstoffes. Wird dieser Zusatz fortgelassen, erscheint die blaue Farbe der Lösung von der Oberfläche an allmählich rötlich verändert. Die Farbänderung wird selbstverständlich beim Schütteln stark beschleunigt. Der in der Histidinbromlösung entstehende Farbstoff soll überhaupt bei alkalischer Reaktion gegen Sauerstoff empfindlich sein. Die rotviolette Verfärbung, die in reiner Histidinlösung nach der Vorschrift von Kapeller-Adler bei ammoniakalkalischer Reaktion entsteht, vertieft sich auch von der Oberfläche her.

Wenn die Histidinbestimmung nach dem oben erwähnten Prinzip ausgeführt wird, ist die Intensität der blauen Verfärbung in weitem Bereich dem Histidingehalt proportional. Die alkalische Lösung kann auch mit Wasser verdünnt werden, wobei sich die Farbintensität der Verdünnung umgekehrt proportional verhält.

Eine bestimmte Menge Histidin, die der Organsuspension zugesetzt wird, kann nach der Enteiweissung des Gemisches in einfacher Weise bemessen und quantitativ wiedergefunden werden. Daher ist diese Mikrobestimmungsmethode besonders geeignet zur Histidaseuntersuchung mit Organsuspension oder Extrakt. Falls der Histidingehalt sehr gering ist, muss die Aminosäure angereichert werden. Im Harn ist eine individual ziemlich schwankende Menge Histidin vorhanden, die aber meistens zu klein ist, um direkt zur Analyse gebraucht werden zu können.

Ausserdem befinden sich im Harn chromogene Substanzen, die die Bromreaktion des Histidins durch Einmischen andersartiger Farbe stören. Ich habe daher den Harn zuerst mit alkalischem Phosphat gegen Phenolphthalein neutralisiert und mittels aktiver Kohle entfärbt. Durch dieses Verfahren wird kein Verlust des Histidins verursacht und das in alkalischer Reaktion sich niederschlagende Erdalkali wird gleichzeitig entfernt, was für die nachherige Kolorimetrie in alkalischer Reaktion zweckmässig ist. Zur Anreicherung des Histidins wird das Filtrat, wie Lang (1933) ausgeführt hat, mit Quecksilbermischung und Borax behandelt. Das abzentrifugierte Histidinquecksilbersalz wird in 4% Trichloressigsäure gelöst und durch Einwerfen eines Körnchens Natriumsulfid entquecksilbert, wobei die in Trichloressig unlöslichen Substanzen zusammen entfernt werden. Der Gebrauch des Natriumsulfids ist einfach und zweckmässig, weil Durchleiten von H_2S eine geringere Histidinmenge als die zugesetzte theoretische Menge nachweisen lässt. Das Bromieren der entquecksilberten Lösung wird wie bei den einfach enteweissten Lösungen ausgeführt. Man kann damit das dem Harn zugesetzte Histidin wieder quantitativ bestimmen, wenn auch der Harn an sich schon reichliche, über 3-4 fache Mengen Histidin oder gar eine kaum nachzuweisende Menge davon enthält.

Erforderliche Reagenzien und die Ausführungstechnik werden unten angegeben. Das Verfahren bez. des Harns wird zuletzt beschrieben.

Erforderliche Lösungen:

- 1) 16 g/dl wässrige Trichloressigsäurelösung.
- 2) Bromchloroformlösung: 5 ccm Br + 95 ccm Chloroform.
- 3) 8 g/dl Trichloressigsäure in Chloroform.
- 4) Essigsäure-Ammoniumacetat-gemisch: 100 ccm 16 g/dl Ammoniumacetat werden mit 30 g/dl Essigsäure (56-57 ccm) versetzt, bis das Gemisch gegen Bromkresolgrünpapier PH von 4.6 zeigt.
- 5) 0.6 g/dl KCN.
- 6) Glycerin: 2 Teile Glycerin (P. J. V) werden mit 1 Teil Wasser gemischt.

7) 20 g/dl KOH zur Analyse.

8) Standardlösung: $M/80$ Histidinmonochlorid. 100 cem = 184 mg Histidin. 1 cem = 1.84 mg Histidin. Man kann natürlich die Konzentration der Standardlösung so wählen, dass 200 mg Histidin in 100 cem Wasser enthalten sind.

Erforderliche Apparate:

Kolorimeter. 10 cem Messzylinder mit Glasstöpsel. Kleine Scheidentrichter von ungefähr 15 cem Inhalt mit Glasstöpsel.

Ausführung: 1) Enteiweissung der histidinhaltigen Versuchslösung mit gleicher Menge 16% Trichloressigsäure.

2) Bromierung: 4 cem klares Filtrat werden in Scheidentrichter einpipettiert, mit 1 cem Bromchloroform versetzt, ein paar Sekunden stark geschüttelt, ca. 10 Minuten stehen gelassen und Bromchloroform abgegossen. Die wässrige Schicht ist gelblich gefärbt, sie wird durch 3 malige Ausschüttelungen je mit 2 cem 8% Trichloressigsäure-chloroform entfärbt, durch trockenes Papier filtriert und weiter behandelt. Das Filtrat ist klar und farblos, verfärbt sich aber beim Stehenlassen allmählich blauviolett, falls eine mässige Menge Histidin vorhanden ist. Die Geschwindigkeit der Farbenentwicklung ist weit langsamer als bei $\text{pH } 4.6$.

3) Farbenentwicklung: 1 cem Filtrat wird in 10 cem Messzylinder einpipettiert, mit Essigsäure-ammoniumacetatlösung auf 4 cem Marklinie gefüllt, gut gemischt, dann mit Cyanidlösung auf 5 cem Marklinie gefüllt, wieder gut gemischt und bei Zimmertemperatur 25–30 Minuten stehen gelassen.

4) Alkalisierung: Inhalt des Zylinders wird mit verdünntem Glycerin auf 7 cem Marklinie gefüllt, gut gemischt, dann mit 20% Kalilauge auf 10 cem gefüllt und wieder gemischt.

5) Vergleichslösung: 2 cem Standardlösung werden im Scheidentrichter mit 2 cem Trichloressigsäure gemischt und in gleicher Weise wie oben bromiert. Weiterer Verlauf des Verfahrens sonst gleich.

6) Kolorimetrie: Da Versuchslösung und Standardlösung in ganz gleicher Weise behandelt wurden, kann man aus der

Kolorimeterablesung sofort den Histidingehalt in 1 ccm Versuchslösung oder seinen Prozentgehalt berechnen. Bei der Kolorimetrie gilt das Beersche Gesetz in weitem Bereich.

Die Anreicherung des Histidins bei niedrigem Gehalt und die Beseitigung der störenden Substanzen werden als Beispiel am Harn beschrieben.

Erforderliche Reagenzien:

- 1) alkalische Phosphatlösung: gleicheiliges Gemisch von 10 g/dl NaOH und 10 g/dl krystallisiertem Na_2HPO_4 .
- 2) aktive Kohle.
- 3) 1 g/dl Phenolphthalein in Alkohol.
- 4) Quecksilberlösung von Hinsberg: 150 ccm gesättigte Sublimatlösung werden mit 70 g krystallisiertem Natriumacetat und 10 g NaCl versetzt.
- 5) gesättigte (3–4 g/dl) Boraxlösung.
- 6) 4 g/dl Trichloressigsäure in Wasser.
- 7) Natriumsulfid zur Analyse.
- 8) Natriumchlorid.

Ausführung: 20 ccm Harn werden im Messzylinder mit 1 Tropfen Phenolphthalein versetzt, mit alkalischer Phosphatlösung schwach alkalisch gemacht, mit Wasser auf 25 ccm gefüllt, mit ungefähr 0.1–0.15 g aktiver Kohle geschüttelt und filtriert. 20 ccm farbloses Filtrat werden im Zentrifugenglas mit 1 g Kochsalz und 2 ccm Quecksilberlösung gemischt und nach Phenolphthaleinzusatz mit Borax schwach alkalisch gemacht. Nach einigen Minuten wird der Niederschlag durch Zentrifugieren gesammelt, in ein kleines graduiertes Zentrifugenrohr mittels Wassers eingespült, nochmals zentrifugiert und der Bodensatz auf 4 ccm Marklinie mit 4% Trichloressigsäure aufgefüllt. Der grösste Teil des Niederschlages geht in Lösung. Ein stecknadelkopfgrosses Körnchen Natriumsulfid wird dazu geworfen, es entsteht sofort ein grauer bis schwarzer Niederschlag, die Lösung wird dann durch trocknes Filtrierpapier direkt in Scheidentrichter filtriert und in oben erwähneter Weise bromiert und filtriert. 1 ccm Filtrat wird zur Farbenentwicklung verwandt. Das weitere Verfahren ist gleich.

Berechnung: Bei der Bromierung war der Histidinquecksilberniederschlag, der aus 20 ccm $5/4$ fach verdünnten Harn gefällt wurde, in 4 ccm Trichloressigsäure gelöst vorhanden. 1 ccm dieser Lösung entspricht also 4 ccm Harn und wird zur Farbenentwicklung gebraucht. Die Standardlösung wird andererseits mit gleichem Volumen Trichloressigsäure verdünnt und bromiert und 1 ccm davon zur Farbenentwicklung verwandt. Dies enthält, falls die Konzentration der Standardlösung 200 mg/dl bzw. $M/80$ ist, 1.0 mg bzw. 0.97 mg Histidin. Man kann daher aus der Kolorimeterablesung sofort den Histidingehalt in 4 ccm Harn, dann seinen prozentualen Gehalt ausrechnen.

Mit vorliegender Methodik der Histidinbestimmung habe ich zuerst die Histidinspaltung durch tierische Organe untersucht. Edlbacher (1926) hat das histidinabbauende Ferment Histidase genannt und schon viele eingehende Studien berichtet. Seine Angabe konnte bestätigt werden: die Histidase ist nämlich nur in der Leber vorhanden, sie wirkt optimal bei $\text{pH } 9$.

1. Histidinspaltung durch Glycerinextrakt der Kaninchenleber.

1 Teil frischen Kaninchenleberbrei wurde mit 4 Teilen 50% Glycerin im Eisschrank 40 Stunden extrahiert. Die zentrifugierte überstehende Lösung diente als Fermentlösung. Versuchsdauer 22 Stunden bei 37° .

$M/10$ Histidin

(gegen Phenolphthalein neutralisiert) 2.0 ccm

Wasser 1.0 „

Puffer ($M/10$ Glykokoll-Natron) 3.0 „

Fermentlösung 2.0 „

Toluol 0.15 „

Die Endkonzentration des Histidins ist $M/80$. In dem ohne Histidinzusatz angestellten Kontrollversuch konnte sofort sowie nach 22 Stunden kein messbares Histidin gefunden werden.

pH	7.0	8.0	9.0	9.4	9.6
Spaltung %	24.2	42.1	59.5	56.8	50.0

2. *Histidinspaltung durch verschieden verdünnten wässerigen Extrakt der Rattenleber.*

FrISChe Leber wurde im Mörser zermahlen, mit 2 fachem Volumen Wasser versetzt und nach 10 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde unverdünnte Fermentlösung benannt. Zusammensetzung der Versuchslösung war wie oben, aber mit 2 cem $M/10$ K_2HPO_4 statt Glykokollpuffer. PH betrug 8.4, Versuchsdauer 24 Stunden bei 37°.

Verdünnung d. Fermentlösung	unverd.	2 fach	4 fach	8 fach	16 fach
Spaltung %	100	60	39.5	26	20

Niere, Milz, Magen- und Darmschleimhaut und Muskel der Ratte wurden in gleicher Weise mit 4 fachem Volumen Wasser extrahiert und die frischen Auszüge als Fermentlösungen gebraucht. Das Histidin konnte bei jedem Ansatz nach 24 Stunden wieder 100% nachgewiesen werden.

Über den Histidinnachweis im Harn zur Schwangerschaftsdiagnose wurde seit der Mitteilung von Kapeller-Adler (1934) von vielen Seiten geforscht. Über die Spezifität dieser Bromwasserreaktion für die Schwangerschaft sind die Meinungen der Autoren aber noch geteilt. Neuerdings haben Tschopp, W. und Tschopp, H. (1938) diese Frage aufgenommen und bei 300 Patienten Harnuntersuchungen ausgeführt. Die bisherige Literatur über die Histidinurie wurde von ihnen zusammengestellt. Bei den Schwangeren kommt danach Histidinurie sehr häufig vor, jedoch scheiden auch die Nichtschwangeren und die Männer Histidin aus.

Ich habe nach der oben erwähnten Methode bei meinen Kollegen (Ärzten) das Harnhistidin gemessen. Histidinnurie verschiedenen Grades wurde dabei beobachtet, bei einem Individuum konnte an einem Tage keine Histidinurie, am nächsten Tage aber 7.8 mg/dl Histidin nachgewiesen werden. Ich möchte daher darauf verzichten, einzelne Zahlen zusammenzustellen und bloss einige Beispiele der Versuche angeben, wie das dem Harn zu-

gesetzte Histidin wiedergefunden wurde. Die Histidinbestimmung wurde A. an 20 ccm Harn und B. an 20 ccm Harn + 1 ccm $M/80$ Histidin (= 9.7 mg Histidin für 100 ccm Harn) ausgeführt.

Person	für 100 ccm Harn umgerechnet		
	A	B	C
K.O.	42.0 mg	51.5 mg	9.5 mg
K.A.	19.5 "	29.4 "	9.9 "
S.O.	Spur	9.5 "	9.5 "
M.S.	0	9.5 "	9.5 "
S.E.	15.1 mg	24.9 "	9.8 "
T.S.	6.4 "	16.4 "	10.0 "

Histidin gehört zu den lebenswichtigen Aminosäuren. Falls das Histidin bei Menschen unter Umständen unverändert im Harn ausgeschieden wird, muss der Umsatz dieser Aminosäure eingehend biochemisch untersucht werden. Dabei ist der einfache qualitative Nachweis nicht hinreichend. Aus diesem Grund glaube ich, dass die oben erwähnte Methodik der Histidinbestimmung im Harn, obwohl sie wegen der quantitativen Massnahme weit komplizierter als die Kapeller-Adler'sche Reaktion oder ihre Modifikationen ist, doch die Untersuchungen bez. der Histidinurie fördern wird.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wird eine Mikrobestimmungsmethode des Histidins beschrieben. Sie beruht auf der Knoopschen Bromwasserreaktion und besteht aus 1) vollständigem Bromieren des Histidins, 2) Entfernung des überschüssigen Broms durch Chloroformextraktion, 3) Farbenentwicklung bei P_H 4.6 unter Pufferzusatz und 4) Kolorimetrie der schönen blauen stabilisierten Farbe in alkalischer Reaktion. Bei der Histidaseuntersuchung mit Organsuspension oder Extrakt kann man den Versuchsansatz durch Trichloressigsäure enteiweissen und das Filtrat direkt zum Bromieren gebrauchen. Der Histidinbestimmung im Harn muss Entfernung der Harnfarbstoffe sowie der Erdalkalien und Anreichern der

Diaminosäure vorangehen. Gesunde erwachsene Männer scheiden eine ziemlich schwankende Menge Histidin aus. Das dem Harn zugesetzte Histidin kann quantitativ wieder nachgewiesen werden.

LITERATUR.

- Edlbacher, S. (1926): Z. physiol. Chem., **157**, 106.
Földes, F. (1936): Biochem. Z., **283**, 199.
Hunter, G. (1922): Biochem. J., **16**, 637.
Kapeller-Adler, R. (1934): Biochem. Z., **264**, 131.
" (1934): Klin. Wschr., 1934 I, 21.
" (1934): Wien. Klin. Wschr., 1934 I, 168.
" (1936): Klin. Wschr., 1936 II, 1728.
Knoop, F. (1908): Beitr. chem. Physiol. u. Pathl, **11**, 356.
Lang, K. (1933): Z. physiol. Chem., **222**, 3.
Sera, K. (1936): Nihon Seikag. Kh. (japanisch), **11**, 216.
Tschopp, W. u. Tschopp, H. (1938): Biochem. Z., **298**, 206.
Vogel, C. (1929): Brit. med. J., 1928 II, 829.
Weiss, M. (1934): Klin. Wschr., 1934 II, 1579.

ON THE MECHANISM OF THE ACTION OF HEXOKINASE.

BY

SADAYA IRI.

*(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College.
Director: Prof. N. Ariyama.)*

(Received for publication, March 13, 1939)

While glycogen is disintegrated into lactic acid by muscle tissues, the decomposition of glucose is accomplished only on the addition of Meyerhof's hexokinase to the glycolytic enzyme system of the tissues. As to the mechanism of the action of hexokinase, Meyerhof (1927) offered the hypothesis that reducing sugars might be converted into "reactive forms" by this enzyme. Later (1935) he stated that glucose was directly phosphorylated by hexokinase in the presence of adenosine-triphosphoric acid. On the basis of this statement, Oppenheimer (1938) assumed that hexokinase should be identical, at least in part, with Euler's phosphorylase. Holmes (1937) expressed the view that glucose might be converted into hexosediphosphate by muscle extracts in the presence of hexokinase and then broken down to lactic acid. However, the allocation of the exact part attributable to hexokinase in the glycolytic process is a problem which has yet found no conclusive solution.

Recently Willstätter and Rohdewald (1937 i) introduced a new link into the chain of glycolysis. They pointed out that at the initial stage of the production of lactic acid from glucose by leucocytes, the sugar was first synthesized to glycogen and the latter substance suffered subsequent changes into lactic acid. A similar phenomenon was also observed by them (1937 ii) in the case of the fermentation of glucose by yeast. If this reaction be conceived of as involving actually the initial stage of the breakdown of glucose, the hypothesis that in the presence of hexokinase muscle tissues might acquire the ability to utilize glucose by synthe-

sizing glycogen from it, appears attractive. The experiments, the results of which will be reported in this paper, were devised with the object of verifying the correctness of this hypothesis.

EXPERIMENTAL.

Hexokinase was prepared from autolyzed baker's yeast by the method of Meyerhof (l.c.). The glycolytic enzyme system used was the Meyerhof extract of rabbit muscle. Glucose was determined by the Hanes method (1929), glycogen by the Pflüger method, and free phosphate by the Teorell method (1931). All the determinations were carried out with the trichloroacetic acid filtrates of the solutions to be tested.

The results of two experiments out of nine, in all of which the synthesis of glycogen from glucose was achieved, are listed in Table I. A rapid production of glycogen was noticed within a minute or two after the start of the reaction. Then it rose slowly to a maximum and receded after several minutes. The increase of glycogen was not quantitatively accounted for by the concomitant decrease of glucose. These facts can be interpreted as indicative of the immediate attack of the glycolytic enzyme on the glycogen as soon as it is synthesized.

In one case (Experiment I) where the formation of glycogen had already reached the maximum after one and half minutes, about 80% of the glucose which had disappeared was found as glycogen, the formation of lactic acid and intermediary products being disregarded. The synthesis of glycogen was accomplished only in the simultaneous presence of muscle extracts and hexokinase, the latter alone being incapable of the synthesis.

Meyerhof's statement that hexokinase alone was able to phosphorylate glucose in the presence of adenosine-triphosphoric acid, was not substantiated in the present experiments. The production of hexosephosphates was never noticed so far as the addition of muscle extracts to hexokinase was omitted. The phosphorylation was judged from the changes in the quantities of inorganic and acid-hydrolysable phosphates, and also from the changes in reducing power and optical rotation. The previous

TABLE I.

The Production of Glycogen from Glucose.

Main experiment: 50 cc. of muscle extract + 25 cc. of hexokinase solution + 200 mg. of glucose + 10 cc. of 2.6% NaHCO_3 solution, diluted to 100 cc. 20°C .

Control experiment: A) The glucose was omitted.

B) The hexokinase was omitted.

At intervals 20 cc. of the solution to be tested were pipetted into 10 cc. of 10% trichloroacetic acid solution and filtered. The determinations of reducing power and of glycogen were made with the filtrates. The determinations at 0 time were carried out with special filtrates which were prepared in small scales by adding each component one after another to trichloroacetic acid.

No. of experiment	Experiment	Time of incubation (min.)	Total reducing power in terms of glucose (mg. %)	Glycogen (mg. %)
I	Main exper.	0	293.9	264.5
		1.5	230.6	311.5
		3	178.7	309.5
		5	145.0	305.0
	Control A	0	96.8	264.0
		1.5	90.0	265.0
		3	84.6	262.5
		5	77.6	261.5
	Control B	0	251.5	197.5
		1.5	249.2	195.0
		3	247.5	194.0
		5	245.0	192.5
II	Main exper.	0	340.3	378.5
		1.5	274.0	412.5
		3	194.0	417.5
		5	191.5	421.5
	Control A	0	142.5	388.5
		1.5	126.5	386.5
		3	116.0	384.0
		5	115.0	377.5
	Control B	0	272.5	177.0
		1.5	265.5	173.5
		3	265.0	170.0
		5	261.5	166.5

incubation of glucose with hexokinase and adenosine-triphosphoric acid for 30 minutes did not produce any intermediary substance which formed lactic acid on the subsequent addition of muscle extracts. This indicated that there was introduced no preparatory change for glycolysis into the molecule of glucose when the sugar was brought into contact with hexokinase.

The synthesis of glycogen from glucose was always accompanied by the disappearance of inorganic phosphate. The phosphorylation was noticed the moment the synthesis began. In order to show the hourly relation between the phosphorylation and the change of glucose, a case where these reactions took place quite slowly is given in Table II. It is shown in Table III that the phosphate which disappeared was found, for the most part, in the fractions which corresponded to hexose-diphosphate and the difficulty hydrolysable esters. Though Willstätter and Rohdewald did not perform any experiment of phosphorylation of glucose in their study of glycolysis of leucocytes, they expressed a view that phosphorylation-products might be formed as the intermediates

TABLE II.

The Production of Glycogen, and Phosphorylation.

Main experiment: 30 cc. of muscle extract + 10 cc. of hexokinase solution
+ 200 mg. of glucose + 10 cc. of 2.6% NaHCO_3 solution,
diluted to 100 cc. 20°C .

Control experiment: The glucose was omitted.

Experiment	Time of incubation (min.)	Free P (mg. %)	Total reducing power in terms of glucose (mg. %)	Glycogen (mg. %)
Main exper.	0	28.9	232.0	122.3
	2	28.0	228.5	125.0
	5	27.3	225.0	127.3
	10	25.0	221.0	123.0
Control exper.	0	28.9	32.6	121.0
	2	28.9	32.2	120.5
	5	28.9	32.0	119.0
	10	28.9	31.0	118.6

TABLE III.

Intermediary Products in the Reaction.

Main experiment: 20 cc. of muscle extract + 10 cc. of hexokinase solution + 4 cc. of 10% glucose solution + 3 cc. of 2.6% NaHCO_3 solution. 16°C .
 Control experiment: 4 cc. of water was added instead of glucose solution.

Experiment	Time of incubation (min.)	Total reducing power in terms of glucose (mg.)	Glycogen (mg.)	Lactic acid (mg.)	P-fractions (mg.)					Total P
					Inorg. P	Triose-P*	7 min.-P	7~180 min.-P	P difficult to hydrolyse	
Main exper.	0	72.96	107.8	45.50	16.87	1.51	1.03	1.12	1.57	20.59
	10	47.31	109.9	62.04	10.37	0.91	2.83	3.29	3.93	20.32
Control exper.	0	33.06	108.4	46.19	16.64	1.66	1.09	0.82	1.90	20.45
	10	29.60	101.6	57.68	14.47	0.25	2.74	1.23	2.08	20.52

* Triosephosphoric acid was determined from the phosphorus which was easily hydrolysable by dilute alkali.

of lactic acid production. This was proved to be the case in the present experiments.

Table IV shows that the synthesis of glycogen from glucose by the action of hexokinase was greatly inhibited by monoiodoacetic acid. The inhibition was almost complete by the addition of 0.005 M monoiodoacetic acid, but incomplete when the concentration was as low as 0.002 M. Fluoride (0.01 M) exerted no noticeable influence on the reaction.

TABLE IV.

The Effect of Iodoacetate on the Synthesis of Glycogen.

Experiment:

A) 50 cc. of muscle extract + 25 cc. of hexokinase solution + 200 mg. of glucose + 10 cc. of 2.6% NaHCO_3 solution, diluted to 100 cc. 20°C .

B) (A) + 10 cc. of 0.05 M monoiodoacetic acid solution (neutralized).

Experiment	Time of incubation (min.)	Total reducing power in terms of glucose (mg. %)	Glycogen (mg. %)
A	0	339.5	337.5
	1.5	267.5	361.5
	3	229.5	367.0
	5	204.0	363.5
B	0	339.5	341.5
	1.5	324.5	340.0
	3	321.0	336.5
	5	319.0	335.0

DISCUSSION.

Considering the evidence cited above, it is probable that, in the presence of hexokinase, the production of lactic acid from glucose by the muscle extract might, at least in part, be made up of a series of changes which begin with the synthesis of glycogen from glucose. This initial change might be construed as preparatory to the ordinary process of forming lactic acid from glycogen by the glycolytic enzyme system of muscle tissues.

In view of the decrease of inorganic phosphate in the very early

stages of the reaction, the possibility is not excluded of a part of the glucose being directly esterified to hexosephosphate by the co-operative action of hexokinase and the enzyme system of muscle extracts. According to Schöffner and Specht (1938), the phosphorylation of glucose by yeast takes place in the following two ways: 1) in living yeast hexosemonophosphoric acid is produced from glucose through the intermediary stage of glycogen, 2) in cell-free extracts the direct phosphorylation of glucose is induced by the oxidation of triose ester.

Another point needing consideration is the possibility that glycogen might be formed indirectly from hexosephosphate which has been initially produced from glucose.

The inhibitory action of monoiodoacetic acid on the formation of glycogen from glucose suggests the possible participation of oxidoreductive reaction in the synthesis.

Whatever the mechanism of the production of glycogen, it is evident that, so far as glycogen is actually formed, the usual glycolytic enzyme system of muscle tissues is concerned in the disintegration of glucose into lactic acid by muscle extracts in the presence of hexokinase.

SUMMARY.

1. Glycogen is synthesized from glucose in the presence of hexokinase and the glycolytic enzyme system of muscle tissues. Hexokinase alone cannot react with glucose. The synthesis of glycogen from glucose is inhibited by monoiodoacetic acid.

2. The mechanism of the production of lactic acid from glucose by the system, muscle extract + hexokinase, has been discussed.

The present writer acknowledges his appreciation of the technical assistance of Dr. K. Iwakawa.

REFERENCES.

- Hanes, C. S. (1929): *Biochem J.*, **23**, 99.
Holmes, B. E. (1937): *Biochem. J.*, **31**, 1730.
Meyerhof, O. (1927): *Biochem. Z.*, **183**, 176.

- Meyerhof, O. (1935): *Naturw.*, **23**, 850.
- Oppenheimer, C. (1938): *Die Fermente und ihre Wirkungen*, Supplement, Lief., **9**, 1348.
- Schäffner, A. and Specht, H. (1938): *Z. physiol. Chem.*, **251**, 144.
- Teorell, T. (1931): *Biochem. Z.*, **230**, 1.
- Willstätter, R. u. Rohdewald, M. (1937 i): *Z. physiol. Chem.*, **247**, 115.
- Willstätter, R. u. Rohdewald, M. (1937 ii): *Z. physiol. Chem.*, **247**, 269.

THE RELATIONSHIP BETWEEN OXIDOREDUCTION AND TRYPTIC AND EREPTIC ACTIVITIES.*

By

JUNJI NAGAI.

(From the Institute of Biochemistry, Kyusyu Imperial University, Hukuoka.
Director: Prof. K. Kodama.)

(Received for publication, April 1, 1939)

As reported last year in this journal, Itoh and his coworkers (1937) made the observation on lipase that oxidation augments fat synthesis and retards the splitting, while reduction does the opposite. This finding seems to be especially interesting and important, because we can reduce the bewildering manifestations of living cells in their anabolic and catabolic processes to the simple condition of oxidoreduction. It is a question, however, whether various other enzymes can be brought into this category or not. According to Voegtlin (1933) cathepsin seems to be promising, since the proteolytic and proteosynthetic actions are controlled to some extent by oxidoreduction.

In this study the author tested out how this relation holds in the case of extracellular proteolytic enzymes such as trypsin-kinase and erepsin. The synthetic action of these enzymes, however, has not been realized under any conditions laid down by the author. It seems rational that nature gives the one-sided activity to such extracellular enzymes. But the author found that the proteolytic activity was concerned, though to lesser extent, with the oxidoreductive behavior of the protein molecule. The mild oxidation of casein or lens protein by hydrogen peroxide increased the resistance for trypsin-kinase, while the reduction by means of hydrosulfite or by a biological reducing system such as succinodehydrogenase and succinic acid accelerated the digestion by the enzyme. It seems

This report was presented in part at the 13th annual meeting of Japanese Biochemical Society at Nagasaki, Oct. 1937.

probable that the most sensitive radical in the protein molecule for such treatments is the sulfhydryl group, as betrayed by the nitroprussid reaction. The fact that the heat-denatured protein shows a stronger sulfhydryl group reaction and, therefore, is much easier digested than the native, agrees with the above result.

Moreover, that some profound change in the protein molecule has occurred, can be assumed from the study of its rotatory power. By oxidation it is usually decreased and by reduction, increased. Whether this effect is related to enolification within the protein molecule is not clear. But it seems interesting to compare the result with Dakin's (1912) observation on the alkali treatment of protein.

The effect of oxidoreduction is of course not only limited to the protein molecule but also to the enzyme. Apart from the problem of coenzyme, the direct oxidoreduction of the enzyme itself should be taken into consideration, because the enzyme is of a protein nature. In this regard, the author tested the activity of erepsin against dipeptide under various redox conditions, and found that also in this case reduction accelerates and oxidation retards the enzyme action.

This finding stands quite in agreement with the fact that in a healthy intestinal tract the reduction prevails owing to micro-organisms. The physiological significance of intestinal flora, therefore, is not only sought in the destruction of undigested food material, but also in keeping the proteolytic enzymes in a reduced condition.

EXPERIMENTAL.

I. The Digestibility of Casein in the Presence of H_2O_2 .

1% casein solution served as the substrate. Trypsin was prepared from hog pancreas by the method of Willstätter and Waldschmidt-Leitz (1923) and enterokinase from hog intestinal mucosa according to Waldschmidt-Leitz (1923). Both were used as glycerol extract. After the reaction mixtures, as shown in Table I, were kept at 37°C for six hours, the determination of

the digestion was carried out by the alkaline titration method of Willstätter in a 90% alcoholic solution and the digestion degree was indicated with the numbers of increased cubic centimeters of $N/10$ KOH. The redox potential of each reaction mixture, which was placed in the water thermostat kept at 37°C , was measured at the beginning of the reaction with a platinum plate electrode.

TABLE I.

The digestibility of casein in the presence of H_2O_2 .

Reaction mixture: 1% casein 3 cc., trypsin 1 cc., enterokinase 1 cc., borate-NaOH buffer ($\text{pH}=8.4$) 2 cc., H_2O_2 1 cc. as in Table 1.

Concentration of H_2O_2	Redox potential Eh in mV	Digestion cc. of $N/10$ KOH
1 M.	+453.4	5.40
1/ 2 M.	+438.7	5.76
1/ 4 M.	+392.0	6.28
1/ 8 M.	+373.0	6.57
1/16 M.	+356.8	6.70
0 M.	+313.5	7.36

The result is shown in Table I. The digestion by trypsin-kinase falls by the addition of H_2O_2 , corresponding to the rising of the redox potential in the reaction medium.

II. *The Activity of Trypsin-Kinase in the Medium of the Succinate-Succinic Dehydrogenase System.*

Succinic dehydrogenase was prepared by the method of Thunberg (1933) from the left ventricle muscle of hog heart and the last centrifugation in the preparation procedure was carried out so slowly that much muscle protein remained in the solution. Thus the solution was used as a dehydrogenase as well as a protein substrate for trypsin. The activity of dehydrogenase was tested as usual. It decolorized methylenblue in 2'15" at 37° in a Thunberg tube containing 3 cc. of enzyme solution, 1 cc. $M/10$ sodium succinate and 1 cc. $M/5000$ methylenblue. The extent of

digestion was determined by a method similar to Exp. 1, after keeping the reaction mixtures in vacuum at 37°C for six hours, and the redox potential, too, was measured by the same method as Exp. I, when the reaction was finished.

TABLE II.

The activity of trypsin-kinase in the medium of the succinate-succinic dehydrogenase system.

Reaction mixture: The succinic dehydrogenase solution 5 cc., trypsin 1 cc., enterokinase 1 cc., *M*/10 Na-succinate as in the table, with buffer (pH = 8.4) filled up to 10 cc.

<i>M</i> /10 Na-succinate in cc.	Redox potential Eh in mV	Digestion cc. of <i>N</i> /10 KOH
0	+158.0	8.35
0.2	+ 23.2	8.95
0.5	- 87.7	9.20
1.0	-167.4	9.41
2.0	-209.6	9.53

The results are indicated in Table II. As one observes in the table, the nascent hydrogen from the succinate-succinic dehydrogenase system augments the digestion of muscle protein by trypsin-kinase, parallel to the fall of the redox potential in the reaction medium.

III. *The Digestibility of Casein in the Presence of Lens Protein.*

As lens protein has a strong reducing property, its effect was tested on the action of trypsin-kinase against casein. Ox eye lens was kneaded with ten times the volume of water in a mortar and after centrifugation the supernatant fluid was used. The other experimental procedures were all similar to Exp. I.

TABLE III.

The effect of lens extract upon the digestion of casein by trypsin-kinase. The reaction system is as follows: 1 cc. trypsin and 1 cc. enterokinase were added to each of them and buffer (pH=8.4) up to 10 cc.

		2% casein in cc.	Lens extract in cc.	Redox potential Eh in mV	Digestibility cc. of N/10 KOH	
					Casein together with lens protein (a) and the latter only (b)	Casein only (a-b)
1	a	2	0	+317.6	6.80	1.60
	b	0	0	—	5.20	
2	a	2	0.1	+307.4	7.17	1.57
	b	0	0.1	—	5.60	
3	a	2	0.2	+285.2	7.70	1.84
	b	0	0.2	—	5.86	
4	a	2	0.5	+267.5	8.90	2.38
	b	0	0.5	—	6.52	
5	a	2	1.0	+243.7	10.56	2.46
	b	0	1.0	—	8.10	

As observed in Table III, by the addition of lens extract the redox potential of the reaction medium drops and the action of trypsin-kinase is accelerated.

IV. *The digestibility of Lens Protein, Oxidised to Various Degrees by H₂O₂.*

40 gm. of ox eye lens was kneaded with a little water and, after centrifugation, the supernatant fluid was taken out and diluted with water to 350 cc. 50 cc. of this solution was treated with 25 cc. of hydrogen peroxide of the concentration given in the table, and after the protein was precipitated with alcohol, dried completely by means of alcohol and ether. For use, a 1% solution in borate-NaOH buffer (pH=8.4) was prepared. Each reaction mixture, which consisted of 3 cc. of this protein solution, 1 cc. of trypsin and 1 cc. of enterokinase, was kept at 37°C for six hours and then the increase of amino-nitrogen of the digestion mixture was deter-

mined by the method of Van Slyke. The redox potential of each protein solution was measured by the same method as in Exp. I.

TABLE IV.
The digestibility of lens protein, treated with H_2O_2 .

Concentration of H_2O_2 in mol.	Redox potential Eh in mV	Digestion mg N
2	+184.8	1.33
1	+166.6	1.46
1/2	+163.1	1.58
1/4	+153.6	1.64
1/8	+149.2	1.67
1/16	+143.5	1.72
0	+126.3	1.83

The result is shown in Table IV. It will be observed that oxidized lens protein has a higher redox potential and less digestibility than the native.

V. *The Digestibility of Casein, once treated with H_2O_2 or Na-hydrosulfite, by Trypsin-Kinase.*

Casein was precipitated from skimmed cow's milk, diluted with ten times the volume of water, and acidified with 10% H_2SO_4 . This casein was purified by precipitating with 10% acetic acid from its alkaline solution and this purification was repeated once more. 50 cc. of 2% alkaline solution of the purified casein was treated with 20 cc. of 2, 1, 1/2, 1/4, and 1/8 mol H_2O_2 solution and, on the other hand, with 20 cc. of 1, 1/2, 1/4, 1/8, and 1/16 mol Na-hydrosulfite solution. Thus treated, casein was precipitated with acetic acid and dried by means of alcohol and ether. The determination of the digestibility and the measurement of the redox potential were carried out as in Exp. IV. The optical rotatory power of a 1% alkaline solution (pH=8.4) of casein was measured at 22°C.

TABLE V a.

The digestibility of casein, treated with H_2O_2 by trypsin-kinase.
 Reaction mixture: 1% casein 3 cc., trypsin 1 cc., enterokinase 1 cc.,
 buffer (pH = 8.4) 1 cc.

Concentration of H_2O_2 in mol.	Redox potential Eh in mV	Optical rotatory power	Digestion mg N
2	+344.8	-0.41°	0.78
1	+326.6	-0.76°	0.83
1/2	+323.1	-0.93°	0.85
1/4	+313.6	-1.17°	0.94
1/8	+303.5	-1.25°	1.16
0	+288.3	-1.42°	1.21

TABLE V b.

The digestibility of casein, treated with Na-hydrosulfite, by trypsin-kinase.
 Reaction mixture: 1% casein 3 cc., trypsin 1 cc., enterokinase 1 cc.,
 buffer (pH = 8.4) 1 cc.

Concentration of $Na_2S_2O_4$ in mol.	Redox potential Eh in mV	Optical rotatory power	Digestion mg N
1	+243.0	-1.88°	1.93
1/2	+252.0	-1.81°	1.81
1/4	+267.5	-1.67°	1.76
1/8	+270.2	-1.60°	1.64
1/16	+283.6	-1.52°	1.48
0	+296.3	-1.37°	1.35

As shown in Table V, the redox potential of casein, once treated with H_2O_2 , is higher than the native, while its digestibility by trypsin-kinase and optical rotatory power is lower; and on casein, reduced with Na-hydrosulfite, this relationship is reversed.

VI. The Effect of Hydrogen Peroxide on Erepsin.

Erepsin was prepared from hog's intestinal mucous membrane by the method of Waldschmidt-Leitz and Schäffner (1925) and its glycerol extract was used. As the substrate, such dipetides were used, as leucylglycine (L-G), glycyl-leucine (G-L),

alanyl-glycine (A-G) and glycyl-glycine (G-G). The reaction mixture consisted of 2 cc. of *M*/10 dipeptide solution, 1 cc. of erepsin, 2 cc. of buffer (pH=7.8) and 1 cc. of H_2O_2 solution of such concentration as given in Table VI. The redox potential of each reaction mixture was measured at the beginning of the reaction at 37°C by a method similar to the previous experiments, and after keeping the reaction mixture in an incubator at 37°C for six hours, the digestion was titrated with *N*/40 KOH by the method of Willstätter as in Exp. I. The digestion degree was indicated with the increased cubic centimeters of *N*/40 KOH.

As observed in Table VI, by addition of H_2O_2 the ereptic activity is retarded, parallel to the rise of the redox potential of the reaction medium.

TABLE VI.
The effect of H_2O_2 on erepsin.

Concentration of H_2O_2	Redox potential* Eh in mV	Digestion cc. of <i>N</i> /40 KOH			
		L-G	G-L	A-L	G-G
0	+308.5	7.3	4.6	4.5	3.6
0.1 M.	+367.8	6.3	3.7	3.8	3.0
0.2 "	+392.0	5.7	3.3	3.1	2.7
0.5 "	+435.7	5.0	3.1	3.0	2.4
1.0 "	+450.5	4.9	3.0	2.7	2.2
2.0 "	+461.4	4.6	2.8	2.5	2.1

* The redox potential was measured only in the case of L-G.

VII. *The Effect of the Succinate-Succinic Dehydrogenase System on Erepsin.*

Succinic dehydrogenase was prepared as in Exp. II. This dehydrogenase decolorized methylenblue in 1'50'' at 37°C in a Thunberg tube, which contained 3 cc. dehydrogenase solution, 1 cc. of *M*/10 sodium succinate and 1 cc. of *M*/5000 methylenblue. The reaction mixture consisted of 2 cc. of *M*/10 dipeptide solution, 1 cc. of erepsin, 2 cc. of buffer (pH=7.8), 3 cc. of dehydrogenase

and $M/10$ sodium succinate solution of volume as described in Table VII. These were introduced into a Thunberg tube with a wide bottom and a capacity of about 30 cc., and water was added up to 12 cc. The measurement of the redox potential and the determination of the digestion were carried out as in Exp. VI, after keeping each reaction mixture in vacuum at 37°C for six hours. It was preliminarily ascertained that erepsin did not digest the dehydrogenase protein.

The result is shown in Table VII. The active hydrogen from the succinate-succinic dehydrogenase system depresses the redox potential of the reaction medium and accelerates the ereptic activity.

TABLE VII.

The effect of the succinate-succinic dehydrogenase system on erepsin.

$M/10$ Na-succinate in cc	Redox potential* Eh in mV	Digestion cc. of $N/40$ KOH			
		L-G	G-L	A-G	G-G
0	+ 301.7	7.1	4.3	4.0	3.4
0.1	+ 57.0	8.5	5.6	5.3	4.3
0.2	-- 6.3	9.3	6.1	6.4	5.2
0.5	-- 98.1	10.2	6.7	6.9	5.7
1.0	-- 180.5	10.3	7.0	7.1	5.7

The redox potential was measured only in the case of L-G.

VIII. *The Effect of the Lens Extract on Erepsin.*

The ox's eye lens extract was prepared as in Exp. III. 2 cc. $M/10$ dipeptide solution, 1 cc. of erepsin, 2 cc. of buffer ($\text{pH}=7.8$) and a lens extract of the volume described in Table VIII, were introduced into a conic flask of about 30 cc. capacity and water was added up to 7 cc. After each reaction mixture was kept in an incubator at 37°C for six hours, the determination of the digestion was carried out. In the preliminary experiment there was no increase of titrating alkali, when the lens extract alone was attacked by erepsin. The redox potential was measured at the beginning of the reaction.

As shown in Table VIII, by the addition of lens extract, the redox potential is depressed and the ereptic activity accelerated.

TABLE VIII.

The effect of the lens extract on erepsin.

Lens extract in cc.	Redox potential* Eh in mV	Digestion cc. of N/40 KOH			
		L-G	G-L	A-G	G-G
0	+294.7	7.3	4.4	4.1	2.9
0.1	+277.4	7.3	4.7	4.5	3.0
0.2	+265.2	8.0	5.3	4.9	3.5
0.5	+241.7	8.6	5.6	5.1	3.8
1.0	+213.5	8.8	5.7	5.4	4.3

* The redox potential was measured only in the case of L-G.

Many thanks are due to Prof. K. Kodama for his kind criticisms and suggestions throughout this research.

REFERENCES.

- Dakin, H. D. (1912): J. biol. Chem., **13**, 357.
 Itoh, R. and Nakamura, T. (1937): J. Biochem., **26**, 187.
 Thunberg, T. (1933): Biochem. Z., **258**, 48.
 Voegtlin, O. (1933): J. Pharmacol. exp. Therap., **48**, 241.
 Waldschmidt-Leitz, E. (1923): Z. physiol. Chem., **132**, 181.
 Waldschmidt-Leitz, E. and Schäffner, A. (1925): Z. physiol. Chem., **151**, 44.
 Willstätter, R. and Waldschmidt-Leitz, E. (1923): Z. physiol. Chem., **125**, 132.

ON THE CHEMICAL STUDY OF FUGU (SPHEROIDES) POISON.

I. Nitrogen distribution in the purified poison.

By

JUNJI NAGAI AND TAKAAKI ITO.

(From the Institute of Biochemistry, Kyusyu Imperial University,
Hukuoka. Director: Prof. K. Kodama.)

(Received for publication, May 15, 1939)

The ovary of the Fugu fish (Spheroides) contains a strong poison, about 20 people a year becoming its victims. Although the pharmacological action of this poison has recently been made clear by Fukuda and his coworker (1937), its chemical nature is still obscure. The first investigation of its chemistry was carried out by Tahara (1911). He isolated the poison in a nearly pure state and empirically suggested its formula as $C_{16}H_{31}O_{16}N$. But nothing was mentioned of the chemical nature of this compound. Next, Ishihara (1924), working with material obtained according to the purification method of Tahara, stated that the poison is chemically an ester of glucose.

The authors also intended to isolate the poison in crystalline form, but have not yet been successful. In the course of this study, however, it was noticed that a reducing carbohydrate, which might have been considered the poisonous substance by Ishihara, is removed by means of $AgNO_3$ and seems to have no toxic value, and that the nitrogen content in the purified poison is considerably higher than Tahara's.

Further, the authors noticed that nitrogen performs an important rôle in the molecule of the poison and found that all of the nitrogen may exist as amine, being attacked by HNO_2 . By treatment with alkali, the poison is readily destroyed, evolving ammonia corresponding to 30% of the total nitrogen. This fact seems to indicate that 30% of the total amines are combined in amide form.

The watery solution of the purified poison turns the polarisation plane to the left; its $[\alpha]_D^{15}$ is -22.85 . Since Lautz's reaction for aromatic amine and the diazo test are negative, it seems probable that the poison is an acyclic compound.

EXPERIMENTAL.

I. Purification method.

Fresh ovaries of the Fugu fish (*Spheroides rubripes*) were pulped in a mortar after the removal of the capsule and extracted for two hours with ten times their volume of water in a boiling water bath. This extract was dialyzed through the bladder membrane of swine and condensed to one-fifth of its former volume under reduced pressure.

The impurities in the condensate were successively precipitated off with HgSO_4 , phosphotungstic acid and AgNO_3 , and the excesses of heavy metals, sulphate and phosphotungstic acid were each time removed with H_2S and hot saturated baryte. The fluid thus obtained was slightly yellow green and had a faint odor, and after the evaporation under diminished pressure a hygroscopic, slightly brown mass, which was very active, remained, with anorganic salts.

II. The relationship between total and amino-nitrogen, dry residue and *dosis minima letalis*.

At each stage of the purification, the total N. by micro-Kjeldahl, the amino-N. by micro-van Slyke, the dry residue, and the *dosis minima letalis* using mice of 12-15 grams body weight were determined.

As seen in Table I, the amount of total N. coincided with that of amino-N. at the final step of purification.

III. The effect of alkali upon the purified poison.

Into the mixture of the purified poison an equal volume of 5N NaOH steam was passed, and the generated volatile base was led through a water condenser into a receiver containing a normal solution of HCl, and determined by titration as usual. In this

TABLE I.

The relationship between the dry residue, total N., amino-N. and
dosis minima letalis.

Fractions	Dry residue in mg	Total N in mg	Amino-N in mg	Dosis minima letalis pro gram of mouse in γ
Dialysate	21.40	2.76	1.46	86.7
HgSO ₄	11.49	1.93	1.01	60.2
Phosphotungstic acid	6.04	1.10	0.78	23.5
AgNO ₃	4.13*	0.68	0.66	11.3*

* A considerable amount of nitrate is contained in this sample, so that the actual weight of poison is much less than this figure.

HCl-solution the authors detected NH₄Cl with Nessler's reagent, but not trimethylamine hydrochloride.

The nitrogen amount of NH₃, generated by treatment with alkali, is shown in Table II. As observed in the table, ammonia nitrogen corresponds to 30% of the initial amount of total N.

TABLE II.

Ammonia nitrogen, generated by NaOH.

No.	Total N in mg	NH ₃ -N in mg	%
1	0.706	0.222	31.4
2	0.824	0.253	30.6
3	0.633	0.188	29.7
Average	—	—	30.5

IV. Some tests on the purified poison.

Ninhydrine and Limini's reactions were positive, but biuret, Millon, murexide and Sakaguchi's reactions, negative. With hypobromite no nitrogen evolves. No coloration was observed with FeCl₃, concentrated H₂SO₄ or HNO₃. Permanganate solution was decolorized by warming, but bromine water was not. The known precipitants and adsorbents for organic bases—such as heavy

metal salts, nitrophenol derivatives, flavianic and pierolonic acid, Rheinecke's salts, rhodanilic and rufianic acid, permutit, aluminas, kaolin, fuller's earth etc.—had no effect. The acylated derivatives were obtained by means of neither acetic acid anhydride nor benzoyl chloride.

SUMMARY.

The authors purified the Fugu poison and the following results were obtained:

1. In the purified poison the amount of total nitrogen agrees with that of amino-nitrogen.

2. When the poison is heated at the alkaline reaction, ammonia is generated, and its nitrogen corresponds to 30% of the total nitrogen.

3. Some tests on the poison were described.

In conclusion, the authors are greatly indebted to Prof. K. Kodama for his kind criticisms and suggestions throughout this research.

REFERENCES.

- Ishihara, F. (1924): *Arch. exp. Pathol. Pharm.*, **103**, 209.
Tahara, Y. (1911): *Biochem. Z.*, **30**, 255.
Yano, I. (1937): *Fukuoka acta medica*, **30**, 1669, 1823.

ÜBER DIE ISODIOXYCHOLENSÄURE.

Notiz über die Spezifität der Hammarstensen Reaktion der Cholsäure.

VON

KAZUMI YAMASAKI, KUMAO TAKAHASHI u.
CHAI HEUNG KIM.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 22. Mai 1939)

In den vorausgegangenen Mitteilungen (Yamasaki 1933/35) wurde berichtet, dass sich unter der Wirkung konzentrierter Salzsäure drei miteinander isomere Dioxycholsäuren $C_{24}H_{38}O_4$, 3.12-Dioxy- $\Delta^{7,8}$ -cholsäure (Dioxycholsäure), 3.12-Dioxy- $\Delta^{8,14}$ -cholsäure (Apocholsäure) und 3.12-Dioxy- $\Delta^{8,9}$ -cholsäure (Isodioxycholsäure) aus Cholsäure bilden, von denen die letztere mit der Entstehung der violetten Halochromie bei der Hammarstensen Reaktion in innigem Zusammenhang steht. Später haben Wieland, Dietz u. Ottawa (1936) unter Brom-Einwirkung aus der Isodioxycholsäure eine neue Dioxycholadiensäure hergestellt, die schon durch Einwirkung 30%iger Salzsäure eine intensive violette Halochromie ergeben konnte.

Wenn man die Cholsäure mit Zinkchlorid oder Antimontrichlorid in Eisessig kocht, so entwickelt sich ein gleicher Farbumschlag (Yamasaki 1933) wie bei der sog. Hammarstensen Reaktion, was zeigt, dass auch durch Einwirkung dieser Chloride die Isodioxycholsäure aus Cholsäure gebildet werden kann. Einerseits um diese Möglichkeit zu bestätigen und andererseits um die Darstellungsmethode der Isodioxycholsäure verbessern zu können, liess man hier verschiedene Metallchloride, wie Zink-, Antimon- und Eisenchlorid auf die Cholsäure unter fast den gleichen Bedingungen, wie bereits Bödecker (1920) gezeigt hat, einwirken. Erwartungsgemäss wurde die Isodioxycholsäure durch die Einwirkung der drei genannten Chloride aus der Cholsäure als äther-

lösliche Fraktion erhalten und zwar bei Eisenchlorideinwirkung in ziemlich guter Ausbeute.

Gemäss den Wieland'schen Formelbildern der drei Dioxycholensäuren (Wieland u. Dane 1932) wird die 3.12-Dioxy- $\Delta^{7,8}$ -cholensäure bei den genannten Reaktionen zwanglos zunächst aus Cholsäure gebildet und dann in die anderen neben- oder hintereinander umgelagert, wie bereits von Yamasaki (1933/35) vermutet wurde, was aber bisher experimentell nicht bestätigt werden konnte. Bei der Einwirkung von Zinkchlorid wurden die Apocholsäure und 3.12-Dioxycholensäure ineinander umgelagert, wie es bei der Einwirkung der Salzsäure der Fall war. Dabei wurde die Isodioxycholensäure als ein Nebenprodukt gebildet.

Bei der von Yamasaki (1933) modifizierten Hammarstensen'schen Reaktion der Cholsäure mittelst konzentrierter Salzsäure ergeben sich beim Versuch auch einige Nachteile: erstens sind einige Versuchsmaterialien in konzentrierter Salzsäure nicht leicht löslich, wodurch der Farbumschlag manchmal entweder erschwert oder sogar unmöglich gemacht wird; zweitens ist die gebildete Farbenlösung meist getrübt und manchmal ein harziges Reaktionsprodukt abgeschieden.

Durch eine kleine Massnahme könnte man jedenfalls die Reaktion leichter und sicherer durchführen: eine Messerspitze Cholsäure bzw. Probematerie wird unter Erwärmen in einem Tropfen Eisessig gelöst, 3–4 Tropfen einer 30–37%igen konzentrierten Salzsäure zugesetzt und dann die Lösung bis zu einer gelben, schwach getrühten Lösung auf dem Wasserbad vorsichtig gekocht. Darauf wird die Reaktionslösung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es entwickelt sich bald ein schöner Farbumschlag: gelb-violettblau-violett.

Es wurde bereits von Yamasaki (1933) behauptet, dass für den Farbumschlag der Hammarstensen'schen Reaktion die Anwesenheit entweder von drei sekundären Alkoholgruppen in der Stellung C_3 , C_7 u. C_{12} des Gallensäuremoleküls oder zwei von ihnen in der Stellung C_3 u. C_{12} mit einer Doppelbindung im Ring B anstatt einer sekundären Alkoholgruppe in der Stellung C_7 notwendig ist. Die erst negativ erwiesene Hammarstensen'sche Reak-

tion der 3.7.12-Trioxysisosterocholensäure (Shimizu u. Kazuno 1936/37) ist durch die verbesserte Methode wieder positiv ausgefallen, was zeigt, dass die Spezifität der genannten Reaktion um so stärker bestätigt wurde.

Durch die Länge der Seitenkette des Gallensäuremoleküls wird die Farbennuance dieser Reaktion, wie aus Tabelle I ersichtlich ist, ziemlich stark beeinflusst, wobei das Absorptionsband um die D-Linie aber stets so deutlich auftritt, dass bei dieser Reaktion, insbesondere bei einer unbestimmten Reaktion, eine spektroskopische Untersuchung unentbehrlich ist.

TABELLE I.

Gallensäuren	Farbennuance	Absorptionsband um D-Linie
Norcholsäure ¹⁾	grünlich violett mit grüner Fluoreszenz	+
Bisnorcholsäure ¹⁾	blau	+
α -Scymnol ²⁾	blau-violett	+
7.12-Dioxycholensäure	gelb	—
3-Keto-7.12-dioxycholensäure ^{3)*)}	violett	+
3-Keto-7.12-diacetoxycholensäure ^{3)*)}	grünlich blau	+
Triacetylcholsäuremethylester	"	+
Trioxysisosterocholensäure ¹⁾	violett	+

1) Für die freundliche Überlassung dieser Präparate sei hier Herrn T. Kazuno bestens gedankt.

2) Vgl. H. Ashikari, J. of Bioch., **29**, 319 (1939).

3) Vgl. T. S. Sihn, J. of Bioch., **27**, 425 (1938).

*) Der Farbumschlag trat hierbei etwas verzögert auf.

Die Hammarstense Reaktion fällt also bei der Gallensäure, die ausser zwei sekundären Alkoholgruppen in der Stellung C₇ u. C₁₂ eine Carbonylgruppe C₃ trägt, wie bei der 3-Keto-7.12-dioxycholensäure auch positiv aus, obwohl die Farbennuance dabei etwas verändert ist, wie sich aus Tabelle I ersehen lässt. Bei der Gallensäure, der entweder eine sekundäre Alkoholgruppe oder Keto-Gruppe in der Stellung C₃ des Gallensäuremoleküls fehlt, wie bei der 7.12-Dioxycholensäure fällt jedoch die Hammarstense Reaktion ganz negativ aus.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Isomerisation der Dioxycholensäuren.

1. Apocholsäure u. Zinkchlorid.

0,5 g geschmolzenes Zinkchlorid wurden in 10 ccm Eisessig gelöst, 3 g Essig-Apocholsäure ($[\alpha]_D^{20} = +42,22^\circ$) zugesetzt und dann 30 Minuten lang vorsichtig gekocht. Beim Stehen in Zimmertemperatur zeigte die Reaktionsflüssigkeit eine stark blaue Verfärbung. Sie wurde in viel Wasser eingegossen und mit Alkalilauge abgestumpft. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde in einer 5%igen Kalilauge eine Stunde lang gekocht und dann mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die abgesaugte, getrocknete Masse (2,7 g) wurde mit 4 ccm Äther mehrere Stunden lang in Zimmertemperatur digeriert und abgesaugt.

a. *Dioxycholensäure*. Der Rückstand (ca. 1 g) wurde im Eisschrank mit 4 ccm absolutem Alkohol digeriert und abgesaugt. Der Rückstand (0,4 g) wurde in Alkohol unter Zusatz von Sodaaflösung gelöst, filtriert und dann mit verdünnter Salzsäure angesäuert, wobei eine Krystallisation auftrat. Die Krystalle wurden mittelst ätherischer Diazomethanlösung methyliert und aus Methanol oder Methanol-Wasser mehrmals umkrystallisiert. Schmelzpunkt $91-93^\circ$. Keine Schmelzpunktdepression mit reinem Dioxycholensäuremethylester. Die aus dem Ester regenerierte freie Säure wurde in Alkohol unter Zusatz einer kleinen Menge von Ammoniak gelöst und dann mit verdünnter Salzsäure gefällt. Diese Behandlung wurde mehrmals wiederholt. Die aus Essigesther umkrystallisierte Säure schmilzt bei $253-255^\circ$. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Dioxycholensäure.

Spezifische Drehung: 32,0 mg Subst. in 10 ccm abs. Alkohol,

$$l = 2 \text{ dm}, \quad \alpha = +0,38^\circ, \quad [\alpha]_D^{20} = +59,38^\circ.$$

3,835 mg Subst: 10,350 mg CO_2 , 3,400 mg H_2O .

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ Ber. C 73,79 H 9,82

Gef. „ 73,60 „ 9,92.

Aus dem von Dioxycholensäure getrennten alkoholischen Filtrat wurde unveränderte Apocholsäure (ca. 0,6 g) wieder erhalten.

b. Isodioxycholensäure. Der Ätherauszug wurde in Zimmertemperatur verdunstet. Das dabei abgeschiedene, mit Krystallen durchsetzte, dicke Öl wurde mit Äther angerührt und wiederum frei abgedunstet. Danach wurde es mit Essigester digeriert und abgesaugt. Ausbeute 0,2 g.

Der abgesaugte Krystall wurde aus Essigester-Methanol oder Methanol-Wasser umkrystallisiert. Schmelzpunkt 197–198°. In Eissessig wurde ein Stückchen der Krystalle gelöst und mit einem Tropfen einer ca. 7%igen Bromlösung versetzt, wobei die Bromfarbe plötzlich verschwindet und ein Farbumschlag folgt: violett-prachtvoll blau-gelb. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Isodioxycholensäure.

Spezifische Drehung: 62,9 mg Subst. in 10 ccm abs. Alkohol.

$l = 2$ dm, $\alpha = +0,07^\circ$, $[\alpha]_D^{100} = +5,56^\circ$.

4,168 mg Subst.: 11,267 mg CO₂, 3,703 mg H₂O.

C₂₄H₃₈O₄ Ber. C 73,79 H 9,82

Gef. „ 73,72 „ 9,94.

2. Dioxycholensäure u. Zinkchlorid.

1,3 g Dioxycholensäuremethylester wurde in 5 ccm Eissessig unter Zusatz von 0,3 g geschmolzenem Zinkchlorid 35 Minuten lang gekocht. Das Reaktionsgut wurde mit viel Wasser versetzt, vom dabei abgeschiedenen Harz abdekantiert und mit einer 5%igen alkoholischen Kalilauge zwei Stunden lang hydrolysiert. Nach dem Abdampfen des Alkohols wurde das Hydrolysat mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Ausbeute 1,1 g.

1,8 g dieser Fällung wurde im Eisschrank mit 5 ccm Äther 6 Stunden lang digeriert, abgesaugt und dann mit Äther gut gewaschen. Die vereinigte Ätherlösung wurde als Isodioxycholensäurefraktion aufbewahrt.

a. Apocholsäure. Der Rückstand (0,6 g) wurde in 3 ccm absolutem Alkohol im Eisschrank über Nacht stehen gelassen und dann abgesaugt. Das Filtrat wurde vom Alkohol unter Zusatz von 2%iger Ammoniaklösung ganz befreit und dann mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die getrocknete Fällung (0,2 g) wurde wiederum mit 1 ccm absolutem Alkohol digeriert und ab-

gesaugt. Das Filtrat wurde mit Wasser versetzt und die dabei abgeschiedenen Krystalle wurden aus verdünntem Alkohol mehrmals umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 172–173°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Apocholsäure.

Spezifische Drehung: 62,4 mg Subst. in 10 ccm abs. Alkohol,

$$l = 2 \text{ dm}, \quad \alpha = +0,56^\circ, \quad [\alpha]_D^{15} = +44,87^\circ.$$

3,588 mg Subst.: 9,739 mg CO₂, 3,165 mg H₂O.

C ₂₁ H ₃₅ O ₄	Ber.	C 73,79	H 9,82
	Gef.	„ 74,02	„ 9,87.

b. *Isodioxycholensäure*. Der Ätherauszug wurde mehrere Tage lang in Zimmertemperatur stehen gelassen, wobei sich sandige Krystalle (0,21 g) abschieden. Sie wurden aus Essigester oder aus verdünntem Alkohol mehrmals umkrystallisiert. Schmelzpunkt 197–198°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Isodioxycholensäure.

Spezifische Drehung: 60,2 mg Subst. in 10 ccm abs. Alkohol,

$$l = 2 \text{ dm}, \quad \alpha = +0,068^\circ, \quad [\alpha]_D^{10} = +5,65^\circ.$$

3,733 mg Subst.: 10,115 mg CO₂, 3,325 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ber.	C 73,79	H 9,82
	Gef.	„ 73,90	„ 9,97.

Isodioxycholensäure aus Cholsäure.

1. *Cholsäure u. Eisenchlorid.*

2 g Eisenchlorid wurden in Eisessig gelöst, 10 g getrocknete Cholsäure in die Lösung eingetragen und dann eine Stunde lang gekocht, wobei durch Abdunsten des Lösungsmittels eine Krystallisation von Eisenacetat auftrat. Ungeachtet der Krystallisation wurde die Reaktionsflüssigkeit in viel Wasser eingegossen und mit Alkalilauge gegen Kongorot neutralisiert. Das dabei abgeschiedene Harz wurde mit 5%iger Kalilauge eine Stunde lang gekocht und dann mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die abgeschiedene Fällung (8,2 g) wurde in 10 ccm Äther vollständig gelöst. Die Lösung erstarrte aber beim Stehen allmählich zu einem Krystallaggregat. Nach weiterem 12-stündigen Stehen im Eisschrank wurden die Krystalle abgesaugt und mit Äther gut gewaschen. Ausbeute

3,0 g.

Sie wurden einmal mit Essigester digeriert und dann aus Essigester oder Essigester-Alkohol mehrmals umkrystallisiert. Der in Essigester unlösliche Teil (ca. 0,1 g) erwies sich als identisch mit Dioxycholsäure. Aus dem in Essigester löslichen Teil wurde Isodioxycholsäure gewonnen. Die Ausbeute an reiner Isodioxycholsäure betrug 2,1 g. Schmelzpunkt 197–198°. Bromreaktion positiv. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Isodioxycholsäure.

Spezifische Drehung: 71,4 mg in 10 cem abs. Alkohol,

$l = 2 \text{ dm}$, $\alpha = +0,08^\circ$, $[\alpha]_D^{15^\circ} = +5,60^\circ$.

4,405, 3,640 mg Subst.: 11,925, 9,840 mg CO_2 , 3,865, 3,210 mg H_2O .

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ Ber. C 73,79 H 9,82

Gef. „ 73,83 „ 9,82

„ „ 73,73 „ 9,87.

Aus dem Filtrat der Isodioxycholsäure wurde eine kleine Menge von Apocholsäure erhalten.

2. Cholsäure u. Zinkchlorid.

10 g Cholsäure wurde in 30 cem Eisessig unter Zusatz von 1,6 g geschmolzenem Zinkchlorid gelöst und eine Stunde lang vorsichtig zum Sieden erhitzt. Die weitere Behandlung wurde fast gleich wie vorher ausgeführt. Die dabei erhaltene Fällung (9,7 g) wurde mit 15 cem Äther digeriert. Da sie dabei nicht vollständig löslich war, wurde am nächsten Tag abgesaugt und mit Äther gut nachgewaschen.

Die vereinigte Ätherlösung wurde in Zimmertemperatur verdunstet, wobei sich ein mit Krystallen durchsetztes, dickes Öl abschied. Wiederum wurde es mit Äther befeuchtet und im Eisschrank über Nacht aufbewahrt. Danach wurden die Krystalle abgesaugt und mit Äther gut gewaschen. Ausbeute 0,3 g. Aus Essigester-Methanol oder Methanol-Wasser wurden sie mehrmals umkrystallisiert. Schmelzpunkt 197–198°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Isodioxycholsäure. Bromreaktion positiv.

Spezifische Drehung: 78,9 mg Subst. in 10 cem abs. Alkohol,

$l = 2 \text{ dm}$, $\alpha = +0,09^\circ$, $[\alpha]_D^{15^\circ} = +5,70^\circ$.

4,295, 3,690 mg Subst.:	11,620, 9,970 mg CO ₂ , 3,800, 3,190 mg H ₂ O.
C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ber. C 73,79 H 9,82
	Gef. „ 73,79 „ 9,90
	„ „ 73,69 „ 9,69.

3. Cholsäure u. Antimontrichlorid.

3 g gereinigte Antimonchloride wurden in 45 ccm Eisessig gelöst, 15 g getrocknete Cholsäure zugesetzt und dann eine Stunde lang vorsichtig gekocht. Die weitere Behandlung wurde in der fast gleichen Weise wie vorher ausgeführt. Das Reaktionsprodukt (ca. 15 g) wurde mit 20 ccm Äther dreimal digeriert. Aus dem vereinigten Ätherauszug wurden 0,8 g Krystalle erhalten, die noch mit einer kleinen Menge von Apocholsäure vermennt waren. Aus diesem Gemisch wurde 0,4 g fast reine Isodioxycholsäure erhalten und aus Essigester oder Methanol umkrystallisiert. Bromreaktion positiv. Schmelzpunkt 196–198°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Isodioxycholsäure.

Spezifische Drehung: 54,4 mg Subst. in 10 ccm abs. Alkohol,

$$l = 2 \text{ dm, } \alpha = +0,06^\circ, \quad [\alpha]_D^{15} = +5,51^\circ.$$

3,420, 3,475 mg Subst.:	9,280, 9,420 mg CO ₂ , 3,000, 3,060 mg H ₂ O.
C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ber. C 73,79 H 9,82
	Gef. „ 74,00 „ 9,81
	„ „ 73,93 „ 9,85.

LITERATUR.

Bödecker, F. (1920): Ber. Chem. Ges., **53**, 1852.

Shimizu, T. u. Kazuno, T. (1936): Zs. Physiol. Chem., **239**, 67.

Shimizu, T. u. Kazuno, T. (1936/37): Ebenda **244**, 167; J. of Bioch., **25**, 245.

Wieland, H. u. Dane, E. (1932): Zs. Physiol. Chem., **206**, 243; **212**, 263,

Wieland, H., Dietz, E. u. Ottawa, H. (1936): Zs. Physiol. Chem., **244**, 194.

Yamasaki, K. (1933): J. of Bioch., **18**, 311.

Yamasaki, K. (1933/35): Zs. Physiol. Chem., **220**, 42; **233**, 10.

ÜBER DIE GALLENSÄURE VON SCHILDKRÖTEN- GALLE; TRIOXYSTEROCHOLANSÄURELAKTON.

VON

CHAI HEUNG KIM.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 22. Mai 1939)

Neuerdings wurden von Yamasaki u. Yuuki (1936) zwei gesättigte Laktone der Sterocholansäurereihe aus der Alligatorschildkrötengalle isoliert, von denen der eine von der Formel $C_{27}H_{44}O_5$ oder $C_{28}H_{46}O_5$ bei 208° schmilzt und eine spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = +32,87^\circ$ hat. Die Säure enthält vier sekundäre Alkoholgruppen im Molekül, von denen drei im Sterocholansäurekern und die eine andere in Seitenkette vorliegen. Dieses Lakton liefert durch Hydrolyse mit Lauge eine Säure vom Schmelzpunkt 140° , bei der Oxydation mit Chromsäure ein Triketolakton vom Schmelzpunkt 306° und eine Tetraketosäure vom Schmelzpunkt 214° . Dieses Triketolakton liefert bei der Oxydation nach Aufspaltung des Laktonringes eine andere isomere Tetraketosäure vom Schmelzpunkt 205° .

Das andere isomere Lakton (Yamasaki 1939) schmilzt bei 220° und hat $[\alpha]_D^{20} = +68,97^\circ$. Die spezifische Drehung der durch Lauge hydrolysierten Säure zeigt $[\alpha]_D^{20} = +35,25^\circ$ und ihr Methylester schmilzt bei 228° , der neuerdings von Yamasaki (1939) als identisch mit dem früher angegebenen Lakton vom Schmelzpunkt 228° erwiesen wurde.

In vorliegendem Versuch wurde die Galle einer Schildkröte (*Emys orbicularis*) untersucht, die mit der Alligatorschildkröte zur gleichen Gattung gehört. Es wurde dabei gefunden, dass in der Schildkrötengalle ein Trioxylakton vom Schmelzpunkt 208° vorkommt, das durch einen Formylester und durch Herstellung seiner Tetraketosäure identifiziert wurde. Diese alle zeigen bei der Mischprobe mit denen aus der Alligatorschildkrötengalle keine Schmelzpunktdepression.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Ungefähr 100 ccm schleimfreier Galle wurden unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure dreimal mit je der gleichen Menge Chloroform geschüttelt. Dabei wurden zwei Fraktionen: eine Chloroform- und eine andere wässrige Fraktion erhalten.

Durch Hydrolyse der letzten Fraktion wurde leider keine krystallisierte Substanz gewonnen. Die vereinigte Chloroformlösung wurde erst mit einer 10%igen Natriumbicarbonat-, dann mit einer 10%igen Natriumcarbonatlösung und zuletzt mit Natronlauge hintereinander je dreimal geschüttelt. Dieser Natronlaugeauszug wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure wieder dreimal mit Chloroform geschüttelt und die Chloroformlösung abgedampft.

Trioxysterocholansäurelacton.

Das dabei zurückgebliebene bräunliche Harz wurde mit warmem Essigäther digeriert, wobei es zu einem Krystallbrei erstarrte. Die abgesaugten Krystalle (2,12 g) wurden aus Essigäther oder Alkohol-Wasser mehrmals umkrystallisiert. Perlmutterglänzende Blättchen vom Schmelzpunkt 207–208°. Liebermann-Reaktion: violettrot-bräunlichrot. Keine Schmelzpunktdepression mit dem Trioxysterocholansäurelacton aus Alligatroschildkröten-galle.

Spezifische Drehung: 63,2 mg Subst. in 10 ccm abs. Alkohol,

$l=2$ dm, $\alpha = +0,40^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = +31,65^\circ$.

$C_{27}H_{44}O_5$	Ber.	C	72,27	H	9,89
$C_{28}H_{46}O_5$	„	„	72,66	„	10,03
	Gef.	„	72,36	„	9,78.

Formylester des Lactons.

50 mg Lacton wurden in 3 ccm reiner Ameisensäure fünf Stunden lang gekocht und unter Zusatz von Wasser vollständig ausgefällt. Die gut gewaschene, getrocknete Fällung wurde aus Methanol mehrmals umkrystallisiert.

Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 230–232°. Keine

Schmelzpunktdepression mit reinem Formylester des Trioxysteroholansäurelactons aus Alligatorschildkrötengalle.

3,820 mg Subst.:	9,503 mg CO ₂ ,	2,870 mg H ₂ O.
C ₃₀ H ₄₁ O ₈	Ber. C	67,72 H 8,33
C ₃₁ H ₄₀ O ₈	„ „	68,09 „ 8,49
	Gef. „	67,85 „ 8,41.

Oxydation des Lactons.

0,2 g reines Lacton (Fp. 208°) wurde in 3 ccm Eisessig mit 0,2 g Chromsäure bei Zimmertemperatur vorsichtig oxydiert. Nach zwei Stunden wurde das Reaktionsprodukt mit Wasser ausgefällt und in Chloroform aufgenommen. Die Chloroformlösung wurde mit einer 5%igen Sodalösung geschüttelt und in zwei Fraktionen: Soda- u. Chloroformlösung geteilt.

1. Die Sodalösung wurde unter Neutralisation mit verdünnter Salzsäure auf dem Wasserbade von Chloroform befreit und dann durch Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die dabei abgeschiedene Masse (0,14 g) wurde aus verdünntem Alkohol oder Aceton mehrmals umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 212–213°. Keine Schmelzpunktdepression mit der Tetraketosäure aus Trioxysteroholansäurelacton.

3,733 mg Subst.:	9,650 mg CO ₂ ,	2,804 mg H ₂ O.
C ₂₇ H ₃₈ O ₆	Ber. C	70,69 H 8,36
C ₂₈ H ₄₀ O ₆	„ „	71,14 „ 8,53
	Gef. „	70,52 „ 8,41.

2. Aus der Chloroformlösung wurde durch Abdampfen vom Lösungsmittel 30 mg Krystallmasse erhalten. Sie wurde aus verdünntem Alkohol wiederholt umkrystallisiert.

Libermann-Reaktion: nur gelb. Schmelzpunkt 300°. Keine Schmelzpunktdepression mit dem aus Trioxylakton der Alligatorschildkröte dargestellten Triketolacton vom Schmelzpunkt 306°. Leider war die Ausbeute zur Analyse nicht ausreichend gewesen.

LITERATUR.

- Yamasaki, K. u. Yuuki, M. (1936): Z. Physiol. Chem., **244**, 173.
 Yamasaki, K. (1939): noch nicht veröffentlicht.

ON THE INFLUENCE OF VARIOUS KINDS OF NUTRITION UPON THE ACETALDEHYDE FORMATION IN THE LIVER.

Report 1

The acetaldehyde formation in the liver of dog nourished by a normal mixed diet.

By

KOKUSHO RI.

*(From the Medical Clinic of Prof. N. Kageura,
Nagasaki Medical College, Japan.)*

(Received for publication, May 26, 1939)

There have been a number of theories advanced on the subject of the decomposition process of carbohydrates in the living body, and it is universally believed that acetaldehyde is one of the intermediate products of metabolism in the oxydation of carbohydrates, but many considerable difficulties have been encountered in the study of acetaldehyde in the animal body because of the fact that this substance is very volatile and very unstable during the process of metabolism. Therefore since the publishing of the report by Neuberg and his co-worker (1916) of a fixation method with the aid of calcium sulfite, experiments relating to the acetaldehyde formation in the various tissues of animals have become very numerous. They have ascertained the formation of acetaldehyde as one of the products of the metabolism of carbohydrates in the cells of warm-blooded animals. Furthermore, studying the formation of acetaldehyde in liver and muscles, they discovered that the addition of various sugars and insulin increased the formation of the substance, and they proclaimed that the carbohydrates were the mother substance of acetaldehyde.

Bornstein and Pantke (1930) studied the formation of acetaldehyde by adding various acetaldehyde-forming substances to liver gruel and observed that glycogen was very important in

the forming of acetaldehyde. A. Utewski (1930) experimented with both normal and washed samples of pigeon muscle gruel and found that the formation of acetaldehyde in the washed gruel was less than that of the normal gruel. Fleischmann (1930) conducted his experiments by adding ethyl alcohol to bone muscle gruel of guinea pigs and found that if the acetaldehyde fixing method was not used, the acetaldehyde thus formed was oxydized and passed off into the next stage of chemical change. Supniewski (1926) stated that the addition of insulin in a test tube experiment or the injection of insulin with grape sugar as well as with fructose in the living body, increased the acetaldehyde formation in both. Toennissen (1924) discovered that a mixture of pancreas and muscle emulsion brought about a high production of acetaldehyde and that the yield of the combination was greater than the two produced separately. Hachiya (1928) made a comparative study of the acetaldehyde formation in the liver and muscles and discovered that the formation was considerably greater in the former.

Moreover the formation of acetaldehyde was not limited to the liver and muscles only, but was also found to appear in other organs. Wolgemuth (1926) made studies of the acetaldehyde formation in the brain and the skin; Utewski and Epstein (1933) studied its formation in the thymus, in thyroid gruel, and in thyroids removed from sufferers from Basedow's disease, and discovered that although the amount was very small, there was undeniable evidence of acetaldehyde formation in them.

Although the liver and the muscles play important roles in the metabolism of carbohydrates, it is a known fact at present that the liver holds the more important position. It is this fact which causes investigators, in their study of the metabolism of carbohydrates, to use the liver in their experiments. That the liver plays an important part in acetaldehyde formation is clear from experiments by investigators mentioned above. It is also known that the function of the liver is greatly affected by various kinds of diets. The fact that the diet exerts a great influence in the metabolism of sugars has been proved by Prof. Kageura (1922). The writer has made a study of the influence of various kinds of nutrition upon acetaldehyde formation in the liver of animals, and

herewith presents as Report I the results of the study of the acetaldehyde formation in the livers of dogs nourished with a normal mixed diet.

METHODS.

The dogs used in this experiment were full grown and healthy. The experiments were conducted after feeding them with a normal mixed diet (beef 7.5 gm., lard 1.0 gm., boiled rice 35 gm., per kilo, per day) for a period of one week. This diet did not decrease their weight. The carotid artery was severed about 24 hours after the last meal, the animals were bled to death, and the liver immediately extirpated. By means of the Hagedorn-Jensen method the blood sugar value of the blood from the carotid artery was determined. Using the same blood, (after removing the fibrin as perfusion fluid) the isolated liver was perfused for an hour, employing the Yamakawa-Mizuki perfusion apparatus. Sodium sulfite was added to the perfusion fluid. After perfusing, a part of the perfusion fluid was taken up and calcium carbonate was first added in order to isolate the acetaldehyde again; then the determination of acetaldehyde was made by the Takahata-Kume method. The amount of acetaldehyde (X) which is formed per 100 gm. of liver was calculated according to the following formula.

$$X = \frac{(a-b)B}{L}$$

a: value (mg%) for acetaldehyde in the fluid after perfusing.

b: value (mg%) for acetaldehyde in the fluid before perfusing.

B: quantity (in 100 cc. unit) for perfusion fluid.

L: weight (in 100 gm. unit) of liver used for perfusing.

RESULTS.

1. *Blank investigation without the liver.*

As a blank investigation I have performed the blood perfusion experiment without the liver. Sodium sulfite fructose was also added to the perfusion fluid. The results are shown in Table I. Throughout this investigation we could not find any acetaldehyde formation in the perfusion fluid either before or after perfusing.

bisulfite, was used here. Various concentrations of sulfite were made and the amounts of acetaldehyde thus obtained are recorded in Tables III, IV, and V. Table II shows the results when sulfite is not added to the perfusion fluid. Tables III, IV, and V show the amounts of acetaldehyde obtained with the various concentrations. As shown in Table II, when sulfite is not added, the acetaldehyde formed in 100 gm. of liver ranged from 0.041 to 0.107 mg

Influence of 0.1% sodium sulfite on acetaldehyde formation in the liver.

[illegible]

Influence of 0.5% sodium sulfite on acetaldehyde formation in the liver.

[illegible]

TABLE V.

Influence of 1.0% sodium sulfite on acetaldehyde formation in the liver.

No.	Sex	B.W. (kg)	Liver (gm)	Condition	Blood (c.c.)	Blood sugar (%)	Acetalde- hyde (mg %)	Increase of acetalde- hyde per 100 gm liver (mg)
15	♀	11.5	450	1.0% Sodium sulfite added	400	0.111	Bef. 0 Aft. 0.367	0.326
16	♀	12.3	450	"	400	0.117	Bef. 0 Aft. 0.586	0.521
17	♂	14.9	476	"	400	0.068	Bef. 0 Aft. 0.421	0.354
(average)								0.400

with an average of 0.071 mg. In the experiments where sulfite was added there is clear evidence of an increase in the acetaldehyde formation. When 0.1% sulfite was added, the figures were 0.256 to 0.468 mg, with an average of 0.367 mg. 0.5% sulfite yielded 0.403 to 0.560 mg, giving an average of 0.463 mg. In the case of 1.0% sulfite, the acetaldehyde formation was 0.326 to 0.521 mg, making an average of 0.400 mg. From these results it seems that within the sphere of this experiment the concentration of sulfite bears no relation to the amount of acetaldehyde captured.

3. *The influence of glycogen and insulin.*

In this experiment, 1.0 gm. of glycogen or 1.0 gm. of glycogen plus 5 units of miniglin (Insulin Takeda) were added. To this the various concentrations of sulfite were also added. The results are shown in Table VI. In 100 gm. of liver, 0.363 to 0.752 mg of acetaldehyde were obtained, an average of 0.592 mg. This shows that the acetaldehyde formation is not markedly increased by the addition of glycogen.

In the tests where glycogen and miniglin were added, the yield was 0.447 to 0.676 mg, with an average of 0.562 mg, also showing no influence.

TABLE VI.

Influence of glycogen and insulin on acetaldehyde formation in the liver.

No.	Sex	B.W. (kg)	Liver (gm)	Condition	Blood (c.c.)	Blood sugar (%)	Sodium sulfite (%)	Acetalde- hyde (mg %)	Increase of acetalde- hyde per 100gm liver (mg)
18	♂	15.6	525	1.0 gm Glycogen added	400	0.124	0.5	Bef. 0 Aft. 0.476	0.363
19	♀	12.0	390	"	400	0.070	0.5	Bef. 0 Aft. 0.733	0.752
20	♀	11.7	400	"	400	0.095	1.0	Bef. 0 Aft. 0.622	0.622
21	♀	13.5	471	"	400	0.145	1.0	Bef. 0 Aft. 0.733	0.623
22	♂	11.5	460	"	400	0.088	0.1	Bef. 0 Aft. 0.690	0.600
(average)									0.592
23	♂	12.0	352	1.0 gm Glycogen + Miniglin 5 units added	400	0.068	0.5	Bef. 0 Aft. 0.393	0.447
24	♂	8.7	400	"	400	0.093	1.0	Bef. 0 Aft. 0.676	0.676
(average)									0.562

4. *The influence of glucose and insulin.*

In these tests, 1.0 gm. of glucose was added, or 1.0 gm. glucose plus 5 units of miniglin. The acetaldehyde formation is shown in Table VII. In 100 gm. of liver, 0.822 to 1.409 mg of acetaldehyde was obtained, giving an average of 1.188 mg. Compared to the results of experiments 2 and 3, this shows a remarkable increase. When glucose and miniglin were added together, the yield was 1.084 to 1.210 mg, or an average of 1.147 mg, showing that there was no influence by miniglin.

5. *The influence of fructose and insulin.*

In Table VIII are shown the results obtained when 1.0 gm. of

TABLE VII.

Influence of glucose and insulin on acetaldehyde formation in the liver.

No.	Sex	B.W. (kg)	Liver (gm)	Condition	Blood (c.c.)	Blood sugar (%)	Sodium sulfitc (%)	Acetalde- hyde (mg %)	Increase of acetalde- hyde per 100gm liver (mg)
25	♂	10.5	352	1.0 gm Glucose added	400	0.075	0.5	Bef. 0 Aft. 1.026	1.166
26	♂	12.6	410	"	400	0.077	0.5	Bef. 0 Aft. 0.843	0.822
27	♂	12.0	468	"	400	0.099	1.0	Bef. 0 Aft. 1.649	1.409
28	♀	9.3	360	"	400	0.088	1.0	Bef. 0 Aft. 1.246	1.384
29	♂	10.9	405	"	400	0.113	0.1	Bef. 0 Aft. 1.173	1.159
(average)									1.188
30	♂	11.5	405	1.0 gm Glucose + Miniglin 5 units added	400	0.124	0.5	Bef. 0 Aft. 1.100	1.084
31	♂	10.0	330	"	400	0.072	1.0	Bef. 0 Aft. 0.998	1.210
(average)									1.147

fructose or 1.0 gm. of fructose and 5 units of miniglin were added to the perfusion fluid. The acetaldehyde formed in 100 gm. of liver was from 0.806 to 2.253 mg, with an average of 1.550 mg, showing a definite increase. In the cases where fructose and miniglin were added together, the values for acetaldehyde in 100 gm. of the liver ranged from 1.116 to 1.275 mg, the average value being 1.196 mg, indicating no influence by miniglin.

6. The influence of lactose and insulin.

When 1.0 gm. of lactose (which is a disaccharide) were added, the amount of acetaldehyde formed was as shown in Table IX. 100 gm. of liver yielded between 0.205 and 0.628 mg or an average

TABLE VIII.

Influence of fructose and insulin on acetaldehyde formation in the liver.

No.	Sex	B.W. (kg)	Liver (gm)	Condition	Blood (c.c.)	Blood sugar (%)	Sodium sulfite (%)	Acetalde- hyde (mg %)	Increase of acetalde- hyde per 100gm liver (mg)
32	♂	12.6	465	1.0gm Fructose added	400	0.113	0.5	Bef. 0 Aft. 2.126	1.829
33	♀	13.0	420	"	400	0.117	0.5	Bef. 0 Aft. 1.906	1.815
34	♀	12.7	400	"	400	0.070	1.0	Bef. 0 Aft. 0.806	0.806
35	♀	10.0	310	"	400	0.084	1.0	Bef. 0.073 Aft. 1.650	2.253
36	♀	10.0	280	"	400	0.110	0.1	Bef. 0 Aft. 0.733	1.047
(average)									1.550
37	♂	9.0	210	1.0gm Fructose + Miniglin 5 units added	400	0.115	0.5	Bef. 0 Aft. 0.586	1.116
38	♂	9.7	230	"	400	0.075	1.0	Bef. 0 Aft. 0.733	1.275
(average)									1.196

of 0.426 mg. We could not recognize any increase from the addition of lactose. The same was true when lactose and miniglin were added, because the average value for acetaldehyde obtained from lactose plus miniglin was 0.507 mg.

In the whole experiment, the amount of acetaldehyde in the perfusion fluid before perfusion was, (besides the 0.018 mg of No. 7 in Table II, and the 0.073 mg of No. 35 in Table VIII) in each case, zero. The value of blood sugar, although it varies in different dogs, ranged from 0.066 to 0.145%.

DISCUSSION.

Neuberg and Gottschalk studied the formation of acetalde-

TABLE IX.

Influence of lactose and insulin on acetaldehyde formation in the liver.

No.	Sex	B.W. (kg)	Liver (gm)	Condition	Blood (c.c.)	Blood sugar (%)	Sodium sulfite (%)	Acetalde- hyde (mg %)	Increase of acetalde- hyde per 100gm liver (mg)
39	♂	8.0	290	1.0 gm Lactose added	400	0.132	0.5	Bef. 0 Aft. 0.403	0.556
40	♂	9.0	250	"	400	0.099	0.5	Bef. 0 Aft. 0.293	0.469
41	♂	10.5	358	"	400	0.101	1.0	Bef. 0 Aft. 0.562	0.628
42	♀	10.0	300	"	400	0.066	1.0	Bef. 0 Aft. 0.154	0.205
43	♂	13.5	420	"	400	0.122	0.1	Bef. 0 Aft. 0.289	0.274
(average)									0.426
44	♀	12.0	452	1.0 gm Lactose + Miniglin 5 units added	400	0.081	0.5	Bef. 0 Aft. 0.513	0.454
45	♀	10.5	340	"	400	0.101	1.0	Bef. 0 Aft. 0.476	0.560
(average)									0.507

hyde in the liver and muscle gruel of warm blooded animals such as cows, horses, sheep, rabbits and guinea pigs; recognized the presence of acetaldehyde in these tissues, and claimed that the presence of this substance was due to the glycogen already present in them. According to their results, in 100 gm. of guinea pig liver at 38 degrees C., 24 hours later the yield of acetaldehyde was 4.08 to 6.95 mg. An addition of 1.0% glycogen and fructose solutions increased the acetaldehyde formation. The addition of glycogen yielded an increase of 2.35 to 2.96 mg, and the addition of fructose yielded an increase of 0.83 to 1.80 mg. When insulin was added with the various sugars, there was a general increase in the formation of acetaldehyde.

In Bornstein's and Pantke's experiments with dogs, their results showed that where the various sugars were not added to the liver gruel, there was no acetaldehyde proved. The addition of glucose, or of glucose and insulin, also showed the same results; that is, no acetaldehyde. An addition of 0.5 gm. of glycogen yielded 0.28 mg acetaldehyde; 0.5 gm. of glycogen and 0.5 gm. of glucose yielded 0.41 mg. (Although when glucose alone was added, there was no acetaldehyde formation.) Moreover, these experimenters noticed that when the various sugars were added combined with glycogen, the amounts of acetaldehyde obtained were greater than the total of the yields obtained separately.

Kortschagin and Lewitow compared the sodium sulfite method used by them and the calcium sulfite method used by Neuberg to fix acetaldehyde from muscle gruel and discovered that there was no great difference between the two. Moreover, they announced that there is no great difference in the amount of acetaldehyde formation due to the difference in concentration of sodium sulfite. Masuda (1912), in the liver perfusion test, discovered a certain substance which was very volatile compared with ethyl alcohol, and which combined readily with iodine and he simply called it an acetaldehyde-like substance. Wohlgemuth and Sorochowitisch (1926) recognized the formation of acetaldehyde in the human liver, and also that the amount was greater in it than in the liver of the guinea pig. These investigators attributed this to the fact that the human liver contains a larger store of carbohydrates than that of the guinea pig.

Looking over the results of my experiments, as shown in Table II, in the normal animal liver I see that although the amount is small, acetaldehyde is present. And if sulfite is used, we are able to obtain a large quantity of the substance as shown in Tables III, IV, and V. Moreover, if the sulfite fixing method is not used in the acetaldehyde formation, it passes on into the next stage of chemical change. Among sugars as agents aiding in the formation of acetaldehyde, we find fructose heading the list, followed by glucose. Glycogen, lactose and insulin do not seem to have any effect on the acetaldehyde formation. Whenever fructose and

glucose were added in the experiments, the former gave an increased yield of acetaldehyde, on the average, 1.550 mg, while the latter increased the yield up to 1.188 mg. This is about twice the increase as exhibited by glycogen, lactose and other tests.

That in case of a carbohydrate-rich diet, the amount of glycogen present in the liver of any normal animal is larger than in the case of a protein-fat diet, or in the case of fasting, has been made clear by Inuzuka (1934) and Miyasaki (1936); and it is under such glycogen-rich conditions that the liver is able to perform its functions well. From the results of my experiments, we can imagine that the oxydizing decomposition of fructose and glucose will be smoothly and fully accomplished by such a normal liver. Considering the results of Table VI, it seems that glycogen is comparatively stable also in such a liver.

SUMMARY.

1. In the liver perfusion test of a normal dog, it was proved that acetaldehyde is formed in the liver.
2. There seems to be no distinct relation between the various concentrations of sodium sulfite and the quantity of acetaldehyde formed.
3. When glycogen, glucose, fructose and lactose are added, only fructose and glucose seem to show an increase in the formation of acetaldehyde. The addition of insulin does not seem to accelerate the formation of acetaldehyde.
4. The formation of acetaldehyde in the liver differs according to individuals.

At this place I wish to express my sincere gratitude to Professor Kageura, my teacher, who has accorded me invaluable guidance in preparing this paper. My thanks are also due to Dr. Sendju for his help and advice.

REFERENCES.

- Borstein, A. and Pantke, R. (1930): *Biochem. Z.*, **225**, 321.
Fleischmann, W. (1930): *Biochem. Z.*, **219**, 19.

- Gottschalk, A. (1924): *Biochem. Z.*, **146**, 582. *Klin. Woch.* **II**, 1356.
Hachiya, T. (1928): *Zika Zassi*, **343**, 2071.
Inutsuka, M. (1934): *Journ. of Biochem.*, **19**, 217.
Kageura, N. (1922): *Journ. of Biochem.*, **1**, 333 u. 389.
Kegeura, N. (1924): *Journ. of Biochem.*, **3**, 205 u. 457.
Kortschagin, M. and Lewitow, M. (1930): *Biochem. Z.*, **224**, 63.
Masuda, N. (1912): *Biochem. Z.*, **45**, 140.
Miyazaki, M. (1936): *Journ. of Biochem.*, **24**, 407.
Neuberg, C. and Färber, E. (1916): *Biochem. Z.*, **78**, 238.
Neuberg, C. and Gottschalk, A. (1923): *Klin. Woch.*, **II**, 1458.
Neuberg, C. and Gottschalk, A. (1924): *Biochem. Z.*, **146**, 164 u. 185.
Neuberg, C., Gottschalk, A. and Strausse, H. (1923): *Deutsch. med. Woch.*, **II**, 1407.
Supniewski, J. V. (1926): *The Journal of Biol. Chem.*, **70**, 13.
Toenniesseu, E. (1924): *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **133**, 158.
Utewski, A. (1930): *Biochem. Z.*, **228**, 135.
Utewski, A. and Epstein, S. (1933): *Biochem. Z.*, **265**, 320.
Wohlgemuth, J. (1926): *Biochem. Z.*, **173**, 258. u. **175**, 232.
Wohlgemuth, J. and Sorocohwitsch, C. (1926): *Arch. f. Verdauungskrht.*, **37**, 225.

ÜBER DIE LEBERARGINASE.

II. Mitteilung. Über die Arginasewirkung bei der Leberautolyse.

VON

MASARU KAIJU

*(Aus dem Utzino-Laboratorium des Instituts für Chemische Forschung
an der Kaiserlichen Universität Kyoto.
Vorstand: Prof. Dr. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 25. Mai 1939)

In der vorigen Mitteilung hat Verf. (1938) über eine Abschwächung der Wirkung der Leberarginase von mit Phosphor vergifteten Kaninchen berichtet, während die Blutarginase und zwar die Plasmaarginase, die bei gesunden Kaninchen nur in äusserst geringem Grad nachgewiesen werden konnte, auffallend stark auftrat.

Damals wurde auch die Vermutung geäußert, dass die diesbezügliche Erscheinung vielleicht etwas mit der gesteigerten Autolysewirkung der Phosphorleber zu tun haben könnte, wie diese Wirkung der Phosphorleber schon von vielen Seiten besprochen worden ist. Man kann hier besonders daran erinnern, dass Ch'ên im hiesigen Institut eine sehr verstärkte Wirkung der katheptischen Autolyse der Phosphorleber festgestellt hat (noch nicht veröffentlicht).

Hier taucht nun eine neue Frage auf, nämlich welcher Einfluss auf die Leberarginase bei der Autolyse ausgeübt werden kann oder ob man den Übergang der freigewordenen Arginase im Blutplasma aus den Zellsubstanzen sicher konstatieren kann. In der vorliegenden Arbeit hat Verf. unter Leitung von Prof. S. Utzino Autolyseversuche mit der Kaninchenleber angestellt. Die gut zerriebene Mazeration der frischen Leber wurde in die beiden Enzymfraktionen—also in eine zentrifugierte obere Flüssigkeitsschicht und in einen abgesetzten Bodensatz geteilt, der mit Wasser auf das ursprüngliche Volumen suspendiert wurde, und der Autolyse bei

37°C unter Berücksichtigung der Reaktion des Mediums unterworfen. Hier sei erwähnt, dass in der ersteren Fraktion die Arginasewirkung etwas mehr als in der letzteren nachgewiesen wurde. Nach einer 24 stündigen Autodigestion bei P_H 5,0 verschwand die Arginasewirkung der beiden Fraktionen völlig, während die bei P_H 7,0 oder bei P_H 7,8 angestellten Digestate der beiden Fraktionen dagegen eine nur etwas geschwächte Arginasewirkung zeigten.

Bei der Manganaktivierung blieb auch die Arginasewirkung des bei P_H 5,0 ausgeführten Digestats der Leber negativ und die der bei neutraler oder bei schwach alkalischer Reaktion geprüften Digestate wurde dabei deutlich verstärkt, obgleich die anfängliche Wirkungsstärke nicht erreicht werden konnte. Falls man die beiden Enzymfraktionen im Eisschrank aber sonst unter den gleichen Bedingungen aufbewahrte, trat die Arginasewirkung fast im gleichen Grad wie bei der frischen Leber ein.

Es soll hier nicht unerwähnt bleiben, dass die Aktivität der einmal bei P_H 5,0 (Citratpuffer) eingestellten Enzymfraktion deutlich herabgesetzt wird, die ursprüngliche Vollaktivität aber durch Zusatz von Mangansulfat wiederhergestellt werden kann, was im weiteren Sinne der reversiblen Aciditätsinaktivität der Arginase die Beobachtung von Edlbacher und Pinösch (1937) bestätigt hat, dass nämlich Salzsäureinaktivierung der Arginase durch das Manganion geschützt oder reaktiviert werden kann. Das Verschwinden der Arginasewirkung durch die bei schwach saurer Reaktion ausgeführten Autolyse spricht sehr wahrscheinlich dafür, dass die Arginase auch durch die katheptische Autolysewirkung beeinträchtigt wurde, wie dies auch mit der Beobachtung von Edlbacher und Pinösch (1937) gut übereinstimmt, dass die Arginase durch Pepsin oder Trypsin zerstört wird. Hier möchte man auch an die Angabe dieser deutschen Forscher erinnern, dass als kolloider Träger der Arginase die Albuminnatur in Betracht kommt. Die Abschwächung der Arginase von Phosphorlebern mag auch in Beziehung mit der gesteigerten katheptischen Autolyse der pathologischen Leber stehen. Für die herabgesetzte Arginasewirkung bei der Autolyse in neutraler oder schwach alkalischer

Reaktion mag wohl auch die bei diesen Medien geschwächte Kathepsinwirkung verantwortlich sein. Bei diesen Reaktionen können aber auch andere Proteasewirkungen z. B. Peptonase, Peptidase, Dipeptidase oder Acylase etc. in Betracht kommen und man dürfte sich hier deswegen besser von einer entscheidenden Aussage zurückhalten.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Der zerriebene Kaninchenleberbrei wurde in 3 Portionen geteilt, die je mit dem 10fachen Volumen Puffer (Citratpuffer von pH 5,0, Phosphatpuffer von pH 7,0 und pH 7,6) suspendiert und dann a) sofort nach der Puffermischung, b) nach der Aufbewahrung unter Toluol bei 37° während 24 Stunden und c) nach

TABELLE I.
Leberarginasewirkung bei der Autolyse.

Säureverbrauch (ccm 0.02 n- H_2SO_4)					
Enzymfraktion		Obere Flüssigkeit		Bodensatzsuspension	
		nicht aktiviert	aktiviert	nicht aktiviert	aktiviert
pH 5,0	a) Sofort nach der Trennung	3,60 3,50	40,10 38,80	1,20 1,20	30,30 27,60
	b) Aufbewahrt 24 Stunden bei 37°C	0 0	0,50 0	0 0	0 0
	c) Aufbewahrt 24 Stunden im Eisschrank	3,50 3,40	39,70 38,20	1,00 0,90	25,30 25,10
pH 7,0	a) Sofort nach der Trennung	36,80 36,30	43,10 42,80	15,00 15,50	25,80 24,90
	b) Aufbewahrt 24 Stunden bei 37°C	24,30 22,80	25,20 25,10	13,60 13,50	17,20 18,00
	c) Aufbewahrt 24 Stunden im Eisschrank	37,30 35,10	41,50 40,10	13,00 13,30	24,70 22,80
pH 7,6	a) Sofort nach der Trennung	39,80 39,90	49,50 48,80	18,40 18,50	30,40 31,20
	b) Aufbewahrt 24 Stunden bei 37°C	28,90 29,50	32,70 32,80	11,70 10,90	14,70 14,20
	c) Aufbewahrt 24 Stunden im Eisschrank	38,90 39,50	44,40 45,10	14,90 17,50	24,10 28,20

der Aufbewahrung unter Toluol im Eisschrank während 24 Stunden auf die Arginasewirkung hin geprüft wurden, nachdem man die Suspension durch Zentrifugieren in eine obere Flüssigkeitsschicht und in den Bodensatz getrennt hatte, der mit Wasser auf das ursprüngliche Volumen ergänzt wurde. Für die Arginasebestimmung wurde der folgende Ansatz bei 37°C 24 Stunden lang digeriert: 5 ccm einer 0,1 Mol-Argininchlorhydratlösung (neutralisiert) + 2 ccm Enzymlösung + 1 ccm Wasser oder 1 ccm 0,01 Mol-Mangansulfatlösung + 7,0 ccm 0,1 Mol-Glykokoll.NaCl.NaOH-Puffer (P_H 9,0) + Toluol.

Nach der Spaltung wurde das Digestat der Ureasewirkung unterworfen, um den gebildeten Harnstoff in Ammoniak überzuführen. Die Ammoniakbestimmung wurde nach Folin vorgenommen.

Als Kontrolle wurde nur die Enzym-Pufferlösung ohne Substrat aber unter sonst gleichen Bedingungen digeriert.

In der Tabelle sind die kontrollierten Werte des Säureverbrauchs angegeben.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Arginasewirkung wurde bei der Autolyse bei P_H 5,0 (37°C, 24 Stunden) völlig aufgehoben, obwohl man sie mit Mangansulfat zu aktivieren versuchte. Die Beeinträchtigung rührt sehr wahrscheinlich von der katheptischen Wirkung her und lässt an die Angabe von Edlbacher und Pinösch (1937) erinnern, dass die Arginase durch Trypsin (Edlbacher und Zeller, 1937) oder durch Pepsin zerstört wird und der kolloide Träger der Arginase von Albuminnatur sein dürfte.

2. Bei der Autolyse bei P_H 7,0 und auch bei P_H 7,6 wurde eine Abschwächung der Arginase, aktiviert und inaktiviert, beobachtet. Dies mag auch teilweise durch die abgeschwächte Kathepsinwirkung bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion erklärt werden, obwohl hierbei auch die Peptonase oder Peptidasewirkung auf Arginase in Betracht kommen kann.

3. Die Aufbewahrung der Lebermazeration im Eisschrank übte fast keine Einwirkung auf die Arginase aus. Hier ist aber

hervorzuheben, dass die Aktivität der Arginase durch Einstellen bei $\text{pH } 5,0$ deutlich herabgesetzt wurde, die Vollaktivität nach der Mangansulfataktivierung aber fast im gleichen Grad wie diejenige des anderen Enzyms zur Erscheinung kam.

Auf die analoge Tatsache haben Edlbacher und Pinösch (1937) schon ihrerseits hingewiesen, indem sie über eine Salzsäureinaktivierung der Arginase berichtet haben, die durch das Manganion geschützt oder reaktiviert werden konnte.

Diese Tatsache dürfte wohl die Beobachtung von Edlbacher und Pinösch (1937) im weiteren Sinne der Aciditätsinaktivierung bestätigen, dass die Salzsäureinaktivierung der Arginase durch das Manganion reaktiviert werden kann.

LITERATUR.

Edlbacher, S. u. Zeller, A. (1937): Zeits. f. physiol. Chem., **245**, 65.

Edlbacher, S. u. Pinösch, H. (1937): ebenda, **250**, 241.

Kaiju, M. (1938): Journ. Biochem., **28**, 405.

Die Arbeit wurde ausgeführt mit Unterstützung von Hattori-Hôkôkai, der ich an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aussprechen möchte.

Prof. Dr. S. Utzino.

ÜBER DIE LEBERARGINASE.

III. Mitteilung. Über die Arginasewirkung auf Acetyl-*l*-phenylalanyl-*d*-arginin.

VON

MASARU KAIJU.

(Aus dem Utzino-Laboratorium des Instituts für Chemische Forschung
an der Kaiserlichen Universität Kyoto.
Vorstand: Prof. Dr. S. Utzino.)

(Eingegangen am 2. Juni 1939)

In Bezug auf die Arginasespezifität wurde schon die Bedeutung der freien Carboxylgruppe des Arginins bei der Arginasewirkung durch die Feststellung der Resistenz des Argininmethylesters und des Agmatins von Edlbacher und Bonem (1925) angegeben. Hier sei auch auf die nur zur Spaltung der einen Hälfte des Guanidinmoleküls führenden Arginasewirkung gegenüber dem Arginylarginin und zwar auf den Abbau des Guanidinkerns der Argininhälfte hingewiesen, die die freie Carboxylgruppe trägt (Edlbacher und Bonem, 1925). Felix und seine Mitarbeiter (1928) zogen schon damals aus den Versuchen mit Benzoylarginin und mit Argininestern denselben Schluss wie Edlbacher und Bonem (1925). Bei der Überprüfung haben Edlbacher und Burchard (1931) neurdings auch die Zerlegung einer der beiden Guanidylreste des Arginylarginins aus Clupein durch die von Peptidase befreiten Kalbsleberarginase bestätigt. Die Frage, welcher der beiden Guanidylreste dem Enzym zugänglich ist, kann hier aber nach ihuen vorläufig nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Auf Grund der Beobachtung von der positiven Harnstoffabspaltung aus Argininsäure haben Calvery und Block (1934) geschlossen, dass die α -Aminogruppe des Arginins nicht wichtig bei der Arginasewirkung ist, während die Resistenz der Guanidin-carbonsäuren (Thomas, 1913 und 1923; Edlbacher und Bonem, 1925), des *d, l*- α -Methylarginins (Steib, 1926) und auch der

ε -Guanido- α -aminocaprinsäure (Steib, 1926) schon berichtet worden ist. Thomas (1923) hat angenommen, dass Arginase ebenfalls zu den Fermenten gehört, die auf ein bestimmtes Substrat ganz spezifisch eingestellt sind.

Hellerman und Stock (1938) haben aber auf die Bedeutung der α -Aminogruppe bei der Arginasewirkung hingewiesen, da die Argininsäure und Guanidovaleriansäure nur im schwachen Grade durch eine grosse Menge von Leberarginase angegriffen wurden.

Nach den Beobachtungen von Mori (1938) wurde der Argininkomplex in den mit Methanol oder mit Phosphorwolframsäure gefällten Abbaustufen der Gelatine z. B. Gelatopepton und Gelatotrypton immer in zunehmender Weise durch Arginase angegriffen, während im Gelatinemolekül nur eine minimale Harnstoffabspaltung bei der Arginasewirkung beobachtet wurde, wie Dauphinee und Hunter (1929/30) schon die Arginasewirkung auf das Trypsindigestat der Proteine gezeigt haben.

Da sonst in der Literatur keine Versuche mit Argininpeptiden gefunden werden konnten, hat Verfasser unter Leitung von Prof. Utzino das Verhalten des Acetyl-*l*-phenylalanyl-*d*-arginins gegenüber der Leberarginase, die von der Acylase- sowie Peptidasewirkung befreit wurde und nur die Arginasewirkung aufwies, untersucht und nur eine schwache Hydrolyse desselben beobachtet (Tabelle I u. II), während eine quantitative Harnstoffabspaltung aus dem Salzsäure-Hydrolysat des Peptids konstatiert wurde (Tabelle III).

Die rohe Rinderlebermazeration, die noch eine Acylase- und Peptidasewirkung entfalten konnte, griff das Peptid im deutlichen Grad an, indem die formolitrierbare Aciditätszunahme im Digestate pararell mit der Harnstoffbildung ging (Tabelle IV).

EXPERIMENTELLER TEIL.

Substrate: Das Acetyl-*l*-phenylalanyl-*d*-arginin wurde nach der Vorschrift von Bergmann (1926/27) dargestellt.

Enzymlösung: Als Enzym diente Rinderlebermazeration, die auf einen Teil Gewebepulver mit 3 Teilen Glycerin-Wasser (1:1) gut zerrieben, koliert und dann einer Reinigung nach der Vor-

schrift von Edlbacher und Burchard (1931) unterworfen wurde. Bei der Digestion mit 2 ccm dieser gereinigten Enzym-lösung ist der Aciditätszuwachs in 5 ccm Digestat (37°, 72 Std.) der folgenden Substrate wie folgt: Benzoylglycin 0 ccm; Benzoyl-diglycin 0 ccm; Diglycin 0,05 ccm; Acetylphenylalanylarginin 0,05 ccm 0,1 n-H₂SO₄ respektive.

TABELLE I.

Spaltung des Acetylphenylalanylarginins durch die gereinigte Leberarginase (37°C, 24 Stunden).

Versuchsansatz: 4,0 ccm 0,1 Mol-Substratlösung + 2,0 ccm gereinigter Arginase + 1 ccm Wasser oder 1 ccm 0,01 Mol-Mangansulfatlösung + 8,0 ccm 0,1 Mol-Glykokoll-NaCl-NaOH Puffer (pH 9,0) + Toluol: 37°C, 24 Stunden. Nach der Spaltung wurde das umpufferte Digestat der weiteren Ureasewirkung unterworfen. Ammoniakbestimmung wurde nach Folin vorgenommen. Als Kontrolle wurden Versuche ohne Substratlösung einerseits oder ohne Enzymlösung andererseits unter den gleichen Bedingungen geprüft. In der Tabelle sind die kontrollierten Werte des Säureverbrauchs in ccm 0,02 n-H₂SO₄ angegeben.

Substrat	Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H ₂ SO ₄)					
	pH 9,0		pH 7,8		pH 7,0	
	nicht aktiviert	aktiviert	nicht aktiviert	aktiviert	nicht aktiviert	aktiviert
Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin	2,20 (5,5%)	3,10 (7,8%)	1,20 (3,0%)	1,70 (4,3%)	0,75 (1,9%)	1,10 (2,8%)

TABELLE II.

Spaltung des Acetylphenylalanylarginins durch die lang dauernde und wiederholte Wirkung der gereinigten Leberarginase (pH 9,0).

Versuchsansatz: Pro 20 ccm 0,1 Mol-Substratlösung + 12 ccm Enzym(aktiviert) + 28 ccm Puffer (pH 9,0). Ammoniakbestimmung in 10 ccm Digestat. Nach 48-stündiger Spaltung (37°C) wurde das Digestat der weiteren Digestion unter neuen Zusatz von 6 ccm Enzym unterworfen. Ammoniakbestimmung in 12 ccm Digestat nach Folin.

Substrat	Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H ₂ SO ₄)						
	Sofort	24 Std.	48 Std.	Enzymzusatz 6 ccm	Sofort	24 Std.	48 Std.
Acetyl-l-phenylalanyl-d-arginin	0,40	1,30	1,35		1,40	1,60	1,60

TABELLE III.

Spaltung des hydrolysierten Acetylphenylalanylarginins durch die gereinigte Leberarginase (pH 9,0, 37°C, 24 Stunden).

Versuchsansatz: 2 ccm einer 1 Mol-Peptidlösung wurden mit 5 ccm 10 n-HCl 6 Stunden lang am Rückfluss gekocht, nach Neutralisieren mit Natronlauge auf 20 ccm mit Wasser ergänzt. Man unterzog 4 ccm dieser Hydrolysatlösung der Arginasewirkung (gereinigt) unter den gleichen Bedingungen wie Tabelle I.

Substrat	Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H ₂ SO ₄)	
	nicht aktiviert	aktiviert
Acetyl- <i>l</i> -phenylalanyl- <i>d</i> -arginin	27,30 (68,3%)	38,90 (97,3%)

TABELLE IV.

Spaltung des Acetylphenylalanylarginins durch die Roh-Lebermazeration des Rindes (pH 9,0, 37°C).

Versuchsansatz: 20 ccm 0,1 Mol-Substratlösung + 10 ccm Lebermazeration (nicht gereinigt) + 70 ccm Puffer (pH 9,0). In 10 ccm Digestat wurde Ammoniak- und Aciditätsbestimmung ausgeführt.

Zeit (Stunden)	Säureverbrauch für Ammon- neutralisation nach der Urease- wirkung in 10 ccm		Aciditätszuwachs bei Formoltitration in 10 ccm	
	ccm 0,02 n-H ₂ SO ₄	in % der Gesamt- guanidin- spaltung	ccm 0,1 n-NaOH	in % der 2 Karboxyle
24	6,30	31,5	0,61	30,5
72	8,10	40,5	0,80	40,0

TABELLE V.

Wirkung der Pankreasmazeration (Schwein) auf Acetylphenylalanylarginin (pH 7,5, 37°C, 72 Stunden).

Versuchsansatz: 5 ccm 0,1 Mol-Substratlösung + 2 ccm Pankreasmazeration + 3 ccm Puffer (pH 7,5). Formoltitration in 4 ccm Digestat.

Substrat	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat	
	ccm 0,1 n-NaOH	in % der 2 Karboxyle
Acetyl- <i>l</i> -phenylalanyl- <i>d</i> -arginin	1,70	42,5

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Acetyl-*l*-phenylalanyl-*l*-arginin wurde durch die gereinigte Rinderleberarginase nur im schwachen Grad gespalten, im deutlichen aber durch die Rohlebermazeration, indem auch die formoltitrierbare Aciditätszunahme in Digestat ungefähr pararell mit der Harnstoffbildung ging.

2. Das Acetylpeptid wurde durch Pankreasmazeration im deutlichen Masse hydrolysiert.

LITERATUR

- Bergmann, M., Stern, F. u. Witte, C. (1926): *Annalen d. Chem.*, **449**, 277.
Bergmann, M. u. Köster, H. (1927): *Zeits. f. physiol. Chem.*, **167**, 91.
Calvery, H. O. u. Block, W. D. (1934): *Journ. biol. Chem.*, **107**, 155.
Dauphinee, J. A. u. Hunter, A. (1929-30): *Biochem. Journ.*, **24**, 1128.
Edlbacher, S. u. Bonem, P. (1925): *Zeits. f. physiol. Chem.*, **145**, 69.
Edlbacher, S. u. Burchard, H. (1931): *ebenda*, **194**, 69.
Felix, K., Müller, H. u. Dirr, K. (1928): *ebenda*, **178**, 192.
Hellerman, L. u. Stock, C. C. (1938): *Journ. biol. Chem.*, **125**, 771.
Mori, T. (1938): *Journ. Biochem.*, **28**, 205 u. 333.
Steib, H. (1926): *Zeits. f. physiol. Chem.*, **155**, 279 u. 292.

Diese Arbeit wurde ausgeführt mit Unterstützung von Hattori-Hôkôkai, der ich an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aussprechen möchte.

Prof. Dr. S. Utzino.

EFFECTS OF REDUCTION AND OXIDATION ON YEAST-SACCHARASE ACTION.

By

RYOJI ITOH AND FUJIO OBO.

(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Hukuoka. Director: Prof. K. Kodama.)

(Received for publication, June 12, 1939)

The present paper¹ describes the experiments carried out in order to determine the effect of reduction and oxidation upon yeast-saccharase action. The results obtained with the enzyme were different from those of ricinus-, pancreas- and serum-lipase; liver-esterase, urease, amylase and dipeptidase which have been reported on by Itoh, Nakamura, Kayashima, Tono, Nakayama, Nagai and Fujimi of this laboratory.

That is, the splitting action of the enzyme was slightly augmented by reduction and retarded by oxidation, but the degree of augmentation and the retardation was not proportional to the marked change of the redox-potential after the addition of reducing or oxidizing agents in the reaction system. Though we lack conclusive evidence, we are led to assume that the sulfhydryl group ($-\text{SH}$) and the endiol group $\left(\begin{array}{c} -\text{C}=\text{C}- \\ | \quad | \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} \right)$ play no essential role in yeast-saccharase.

EXPERIMENTAL.

1. Preparation of the enzyme.

The enzyme used in this experiment was prepared according to the method described by R. Willstätter (1929), that is, the yeast was washed thoroughly with distilled water, a small amount of toluol added and then submitted to autolysation at 30°C for three hours. The autolysate was diluted with distilled water and filtered through a thin layer of frankonit in a Buchner funnel, and to the filtrate was added an equal volume of absolute alcohol at -20°C . The precipitate obtained was dissolved in distilled

water and the undissolved portion was filtered off. This raw enzyme preparation was purified further by being adsorbed with alumina C in *N*/5000 acetic acid and eluted by 0.5% diammonium-phosphate. Finally this eluate was submitted to dialysis against distilled water until it became free from phosphates. The enzyme preparate, thus obtained, showed great activity and when kept in an ice chest retained its strength undiminished for a considerable length of time.

2. *Measurements of the hydrolytic action of saccharase and the redox potential of the reaction system.*

The splitting reaction was carried out in the following system: 20.0 cc. of 10% saccharose solution, 2.0 cc. of phosphate buffer solution of pH 5.5, 2.00 cc. of enzyme solution and 1.0 cc. of oxidizing or reducing agents of various concentrations as shown in Table I. The reaction temperature was 20°C and the reaction time was 60 minutes. At the end of the reaction time, to the reaction mixture was added 5.0 cc. of 10% NaOH to stop the enzymic action. The hydrolytic degree of saccharose by the enzyme was measured by polarisation, using a 20 cm polarisation tube and sodium lamp. Control tests were carried out by adding 1.0 cc. of distilled water instead of 1.0 cc. of oxidizing or reducing agents.

The potential of the reaction system was measured as follows: As the electrode metal, a platinum plate (1×1 cm) was used, and the connection with saturated calomel cells as a half element was made with the KCl-agar bridge. The E.M.F. was measured by the unipivot potentiometer of the Cambridge Instrument Company. The whole apparatus was immersed in a water bath kept at 20°C. Purified nitrogen gas was bubbled through at a constant rate, for the purpose of stirring. The potential was recalculated into E^h by adding 248.8 mv which is the potential of the saturated calomel cell against a normal hydrogen electrode at this temperature.

RESULTS.

1. *Effect of reduction and oxidation on the saccharase action.*

As oxidizing agents hydrogen peroxide and iodine were used; and as reducing agents, sodium hydrosulphite and hydrogen sulphide, of various concentrations as shown in Table I. The results obtained are summarised in Table I. As will be seen in this table, the saccharase action is slightly retarded by oxidation and augmented by reduction, but the degree of augmentation and retardation was not proportional to the marked change of the redox-potential after the addition of reducing or oxidizing agents in the reaction system.

TABLE I.

Effect of H_2O_2 , J_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and H_2S on the yeast-saccharase action.

Concentration of oxidizing agents	Polarisation Degree	Redox potential in Eh	Degree of hydrolysis in %
Control	+7.58		
Concentration of H_2O_2			
0	+1.87	+497.8	57.21
$\frac{\text{M}}{1000}$	+1.87	+500.8	57.21
$\frac{\text{M}}{500}$	+1.90	+512.8	56.91
$\frac{\text{M}}{100}$	+1.93	+526.8	56.61
$\frac{\text{M}}{50}$	+2.01	+573.8	55.81
$\frac{\text{M}}{10}$	+2.09	+686.8	55.01
Concentration of J_2			
0	+1.87	+497.8	57.21
$\frac{\text{N}}{1000}$	+1.89	+518.8	57.01
$\frac{\text{N}}{500}$	+1.96	+551.8	56.31
$\frac{\text{N}}{100}$	+2.20	+618.8	53.90
$\frac{\text{N}}{50}$	+3.77	+711.8	38.17
$\frac{\text{N}}{10}$	+4.33	+921.8	32.56

Concentration of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$			
0	+1.87	+497.8	57.21
$\frac{M}{1000}$	+1.87	+476.8	57.21
$\frac{M}{500}$	+1.86	+419.8	57.31
$\frac{M}{100}$	+1.79	+327.8	58.01
$\frac{M}{50}$	+1.64	+177.8	59.51
$\frac{M}{10}$	+1.51	-302.8	60.82
Saturated H_2S solution added in cc.			
0	+1.87	+497.8	57.21
0.01	+1.87	+480.8	57.21
0.05	+1.85	+218.8	57.41
0.1	+1.68	+ 99.8	59.11
0.5	+1.55	- 77.8	60.42
1.0	+1.41	-116.8	61.82

2. *Effect of reduction on yeast-saccharase inhibited
by various amines.*

Myrbäck (1926) reported that saccharase action is inhibited by aldehyde reagents, especially amines which product Schiff's base ($\text{RCH}=\text{N}\cdot\text{CH}_2\text{R}$) with aldehydes, and that the inhibition is removed by the addition of aldehydes or ketones.

We have investigated whether or not the action of yeast-saccharase which had been inhibited to a maximum degree of various amines (as shown in Table II) is augmented by reduction. In this case 3.0 cc. of enzyme solution was mixed with an equal volume of $M/50$ amines and allowed to stand 10 minutes. From the mixture 2.0 cc. was pipetted out and the enzyme action measured, adding 1.0 cc. of saturated H_2S solution as a reducing agent, by the same method as described in the foregoing experiment. Control tests were carried out by adding 1.0 cc. of distilled water instead

of 1.0 cc. of saturated H_2S solution.

The results obtained are summarized in Table II. As shown in this table, yeast-saccharase inhibited to a maximum degree by amines was not entirely activated by reduction.

TABLE II.
Effect of H_2S on yeast-saccharase inhibited by amines.

Amines	Chemical formulae	Polarisation degree in case of inhibition by amine	Degree of hydrolysis in %	Polarisation degree in case of H_2S reduction after inhibition by amine	Degree of hydrolysis in %
Control		+12.10		+12.10	
H_2O		+ 2.38	61.01	+ 2.38	61.01
Methylamin	CH_3NH_2	+11.92	1.1	+11.93	1.1
Anilin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$	+11.50	3.8	+11.48	3.8
<i>o</i> -Toluidin	$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$	+12.08	0.1	+12.08	0.1
<i>p</i> -Toluidin	$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$	+11.32	4.9	+11.31	4.9
<i>p</i> -Phenylendiamin	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$	+11.36	4.6	+11.36	4.6
Hydroxylamin	NH_2OH	+ 2.39	60.95	+ 2.16	62.39
Semicarbazid	$\text{NH}_2\text{CONHNH}_2$	+ 2.35	61.20	+ 2.15	62.46
Phenylhydrazin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NHNH}_2$	+ 2.36	61.14	+ 2.15	62.46
Dimethylanilin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{N}(\text{CH}_3)_2$	+ 2.39	60.95	+ 2.16	62.39
Diphenylamin	$(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$	+ 2.36	61.14	+ 2.16	62.39

SUMMARY.

The effect of reduction and oxidation on yeast-saccharase action has been studied; the results are summarised as follows:

1. Yeast-saccharase action is slightly augmented by reduction and retarded by oxidation, but the degree of augmentation and retardation is not proportional to the marked change of the redox potential, after the addition of reducing or oxidizing agents to the reaction system.

2. Yeast-saccharase inhibited by amines was not entirely activated by reduction.

The authors are greatly indebted to Prof. K. Kodama for his kind criticisms and suggestions throughout this research.

REFERENCES

- Itoh, R. and T. Nakamura (1937): *J. of Biochemistry*, **26**, 187.
Kayashima, S. (1938): *J. of Biochemistry*, **28**, 175.
Myrbäck, K. (1926): *Z. f. Physiolog. Chem.*, **158**, 160.
Nakayama, H. (1939): *Igaku Kenkyu*, **13**, 297.
Willstätter, R. (1927): *Die Fermente und ihre Wirkungen*, **3**, 790.

STUDIES ON LIPASE.

VI. Effects of Reduction and Oxidation on the splitting Action of Serum-lipase and Milk-esterase.

By

RYOJI ITOH, SHINKICHI KAYASHIMA AND KINSEI FUJIMI.

(From the Institute of Medical Chemistry, Kyusyu Imperial University,
Hukuoka. Director: K. Kodama.)

(Received for publication, June 12, 1939)

The present paper describes the experiments carried out in order to determine the effect of reduction and oxidation upon the splitting action of serum-lipase and milk-esterase, and in addition, to determine the effect of reduction on the inhibited serum lipase by atoxyl or quinine. The results obtained were the same as in the case of ricinus-lipase, pancreas-lipase and liver-esterase which have been reported on in this series by Itoh, Nakamura and Kayashima. That is, the splitting action of serum-lipase as well as milk-esterase is augmented by reduction and retarded by oxidation, and the serum-lipase inhibited by atoxyl or quinine is activated slightly by reduction.

EXPERIMENTAL.

The serum-lipase was prepared from serum obtained from the venous blood of a healthy man and it was diluted with an equal volume of distilled water. Fresh human milk was used as a milk-esterase preparation. The free acids liberated from tributyrin by the splitting action of the enzyme were measured by titrating with $N/20$ KOH alcoholic solution as described below. This method for determining lipase action was devised by us, and the details will soon be published.

The reaction mixture of 0.5 cc. of tributyrin, 1.0 cc. of enzyme preparation, 2.0 cc. of $M/15$ phosphate buffer solution of pH 7.0 (milk-esterase) or pH 7.7 (serum-lipase), 3.0 cc. of 0.5% gelatin

solution and 1.0 cc. of reducing or oxidizing agents of various concentrations (as shown in the following tables) were pipetted into a 50 cc. conic flask (A). For a control test, the same mixture except for the tributyrin was pipetted into another 50 cc. conic flask (B). Flasks A and B were stoppered, shaken 3 minutes vigorously and incubated in a thermostat kept at 37°C for 6 hours. At the end of this reaction time, to flask B was added 0.5 cc. of tributyrin, and to each flask 25.0 cc. of absolute alcohol were added. They were again stoppered, shaken two minutes vigorously and filtered. From this clear filtrate 20.0 cc. was pipetted out and titrated with *N*/20 KOH alcoholic solution, using phenolphthalein as an indicator.

The difference of titration cc. of *N*/20 KOH alcoholic solution between A and B corresponds to the quantities of the free acids liberated from tributyrin by the splitting action of the enzyme.

Control tests were carried out adding 1.0 cc. of distilled water instead of 1.0 cc. of reducing or oxidizing agents.

RESULTS.

I. Effect of oxidation on the splitting action of serum-lipase.

The effect of oxidation by iodine, hydrogen peroxide and the aeration of purified oxygen gas on the splitting action has been studied.

In the oxygenation the enzyme solution was aerated by purified oxygen gas after the addition of a few drops of diluted copper sulphate solution as an oxidizing catalyzator. In the case of testing the effect of hydrogen peroxide on the serum-lipase, the hydrogen peroxide cannot act as an oxidizing agent without removing the catalase and peroxidase in serum previously. To inhibit the catalase and peroxidase completely, to the serum was added an equal volume of *N*/10 KCNS solution, which has no effect on serum-lipase.

The results are summarized in Table I and Table II. As will be seen in these tables, the splitting action of serum-lipase is in-

hibited proportionally with the oxidation of oxygen, iodine and hydrogen peroxide.

TABLE I.

Effect of oxygenation and iodine on the splitting action of serum-lipase.

Oxygenation time in minutes	N/20 KOH titration cc.	Concentration of J ₂ in normal	N/20 KOH titration cc.
0	1.38	0	1.38
15	1.37	1/10000	1.36
30	1.34	1/5000	1.31
45	1.30	1/1000	1.26
60	1.20	1/500	1.20
		1/100	1.14

TABLE II.

Effect of H₂O₂ on the splitting action of serum-lipase.

Addition of N/10 KCNS solution	Concentration of H ₂ O ₂ in mol.	N/20 KOH titration cc.
—	0	0.95
+	0	0.93
+	1/500	0.91
+	1/100	0.72
+	1/50	0.69
+	1/20	0.22
+	1/10	0.20

II. Effect of reduction on the splitting action of serum-lipase.

The effect of reduction by *l*-ascorbic acid, KCN, pyro-catechine and hydroquinone of various concentrations as shown in Table III and Table IV has been studied. The *l*-ascorbic acid used in this experiment was cantan forte "Bayer", which contained 0.1 gm. ascorbic acid in 1.0 cc.

As will be seen in Table III and Table IV, the splitting action of serum-lipase is augmented proportionally with the degree of reduction.

TABLE III.

Effect of *l*-ascorbic acid and KCN on the splitting action of serum-lipase.

Concentration of reductants		N/20 KOH titration cc.
<i>l</i> -Ascorbic acid added in mg.	0	2.07
	1.0	2.07
	5.0	2.08
	10.0	2.10
	50.0	2.20
KCN solution added in mol.	0	2.07
	1/1000	2.11
	1/100	2.16
	1/50	2.47
	1/10	3.06

TABLE IV.

Effect of pyrocatequine and hydroquinone on the splitting action of serum-lipase.

Concentration of reductants		N/20 KOH titration cc.
Pyrocatequine solution added in mol.	0	1.43
	1/50	1.43
	1/100	1.53
	1/500	1.59
	1/1000	1.66
Hydroquinone solution added in mol.	0	1.43
	1/50	1.43
	1/100	1.53
	1/500	1.59
	1/1000	1.66
Hydroquinone solution added in mol.	0	1.43
	1/500	1.46
	1/1000	1.55
	1/5000	1.60
	1/10000	1.65

III. Effect of reduction on the lipolytic action of serum-lipase inhibited by atoxyl and quinine.

It is a well-known fact that atoxyl and quinine inhibit the splitting action of serum-lipase. The inhibiting test upon serum-lipase was done after the method of Rona (1920). That is, 1.0 cc. of serum diluted with an equal volume of distilled water, 2.0 cc. of $M/15$ phosphate buffer solution of pH 7.7, 2.0 cc. of 0.5% gelatin solution and 1.0 cc. of Atoxyl or quinine hydrochloride solution, were pipetted into a conic flask and well mixed. In view of Rona's advice, this mixture was allowed to stand for forty minutes to allow the inhibition to reach its maximum degree. Then 1.0 cc. of KCN solution and 0.5 cc. of tributyrin were added. The other experimental conditions and the measurements of free acids liberated from tributyrin were the same as described in the foregoing experiments. As shown in Table IV and Table V the inhibited serum-lipase is also activated slightly by the reduction of KCN.

TABLE V.

Effect of reduction on the inhibited serum-lipase by atoxyl.

Addition of Atoxyl in mg.	Addition of KCN in mg.	N/10 KOH titration cc.
0	0	1.38
1.0	0	0.29
1.0	0.5	0.29
1.0	1.0	0.33
1.0	5.0	0.69
1.0	10.0	1.10
0	0	1.38
2.5	0	0.02
2.5	0.5	0.02
2.5	1.0	0.07
2.5	5.0	0.24
2.5	10.0	0.60

TABLE VI.

Effect of reduction on the inhibited serum-lipase by quinine.

Addition of quinine hydrochloride in mg.	Addition of KCN in mg.	N/10 KOH titration cc.
0	0	1.43
0.5	0	0.73
0.5	0.5	0.76
0.5	1.0	0.76
0.5	5.0	0.80
0.5	10.0	1.09

IV. Effect of reduction and oxidation on the lipolytic action of milk-esterase.

The effect of hydrogen peroxide and of kalium cyanide of various concentrations (as shown in Table VI) on the splitting action of milk-esterase has been studied. The results are summarized in Table VI. As shown in this table the splitting action of milk-esterase is augmented proportionally with the increasing degree of reduction and retarded proportionally with the increasing degree of oxidation.

TABLE VII.

Effect of H_2O_2 and KCN on the splitting action of milk-esterase.

Concentration of H_2O_2	Degree of hydrolysis in %	Concentration of KCN	Degree of hydrolysis in %
0	30.2	0	28.5
N/100	28.6	N/100	28.5
N/50	22.7	N/50	32.1
N/10	16.2	N/20	37.2
N/5	14.1	N/10	43.8
1N	8.2		

V. Existence and substrate of milk-esterase.

The existence of lipolytic esterase in human, cow and goat milk, and the degree of splitting of substrates such as olive oil, tributyrin

and methylbutyrate have been studied. As shown in Table VII, milk-esterase is present only in human milk and absent in cow and goat milk, and the milk-esterase splits methylbutyrate to a higher degree than tributyrin. Moreover, milk-esterase cannot split olive oil at all. From this fact we are led to assume that milk-esterase is the one which splits the simplest ester.

TABLE VIII.
Existence and substrate of milk-esterase.

Milk	Degree of hydrolysis in %		
	Olive oil	Tributyrin	Methyl butyrate
Human	0	31.6	52.6
Cow	0	0	0
Goat	0	0	0

SUMMARY.

1. The splitting action of serum-lipase as well as milk-esterase is augmented by reduction and retarded by oxidation.

2. Serum-lipase inhibited by atoxyl or quinine is also activated slightly by reduction.

3. Milk-esterase is present only in human milk, and absent in cow and goat milk.

4. Milk-esterase splits the simplest ester.

The authors are greatly indebted to Prof. K. Kodama for his kind criticisms and suggestions throughout this research.

REFERENCES

- Bernhard Zorn (1938): *Fermentforschung*, **15**, 397.
 Itoh, R. (1936): *J. of Biochemistry*, **23**, 299.
 Itoh, R. (1937): *J. of Biochemistry*, **25**, 167.
 Itoh, R. and Nakamura, T. (1937): *J. of Biochemistry*, **26**, 187.
 Kayashima, S. (1938): *J. of Biochemistry*, **28**, 175.
 Rona, P. and Bach, E. (1920): *Bioch. Z.*, **111**, 166.
 Rona, P. and Reinicke, D. (1921): *Bioch. Z.*, **118**, 213.
 Willstätter, R. u. Memmen, Fr. (1923): *Z. f. physiolog. Chem.*, **129**, 1.



STUDIES ON LIPASE.

VII. An alkali-titrating method for the determination of tissue esterase action and the results obtained by this method.

BY

RYOJI ITOH AND SINKICHI KAYASHIMA.

(From the Institute of Medical Chemistry, Kyusyu Imperial University, Hukuoka. Director: Prof. K. Kodama.)

(Received for publication, June 15, 1939)

The stalagmometric method for the determination of liberated free acids from tributyrin by tissue esterase splitting has been reported by Rona and Michaelis(1911). But this method is somewhat complicated, therefore the authors devised a simple alkali-titrating method which can be applied to the study of tissue esterase. The details of this method and the esterase action of various tissues measured by this method are reported in this paper.

EXPERIMENTAL.

2 gm. of tissue were minced thoroughly in a mortar adding a small amount of purified sea sand and 8 cc. of distilled water, and it was then filtered through muslin. One portion of the filtrate was used as an enzyme preparation.

The hydrolytic reaction was carried out in a conic flask of 50 cc. volume. 0.5 cc. of tributyrin (olive oil or methylbutyrate), 2.0 cc. of enzyme preparation, 2.0 cc. of phosphate buffer solution of pH 7.0, and 3.0 cc. of 0.5% gelatin solution (which was added for the purpose of fat emulsification) were pipetted into this flask which was stoppered, shaken vigorously for three minutes and placed in a thermostat kept at 37°C for five hours. At the end of this reaction time, exactly 25.0 cc. of ethylalcohol were added to this flask, which was again stoppered, shaken two minutes vigorously and filtered. From this clear filtrate 20.0 cc. was pipetted

out and titrated with *N*/20 KOH alcoholic solution, using phenolphthalein as an indicator.

In the control tests 0.5 cc. of tributyrin were added to the reaction system at the end of the reaction time but all other experimental procedures were the same as described above.

RESULTS.

The lipolytic action of esterases in various tissues has been studied. The results are summarized in Tables I, II, III, IV, V and VI. As shown in Table I, the lipolytic action of esterases in tissues depends upon the natural content of reducing substances.

TABLE I.

The splitting action of tributyrin by esterases in various tissues.

Organ	Animal	Degree of hydrolysis in %
Liver	rabbit	31.8
Spleen	"	29.1
Suprarenal cortex	"	26.4
Kidney	"	24.9
Lung	"	17.4
Testicle	"	17.1
Brain	"	9.3
Uterus	"	8.4
Heart muscle	"	7.5
Thigh muscle	"	2.1
Stomach (all layers)	"	47.0
Mucous layer of stomach	"	94.1
Muscular layer of the stomach	"	37.9
Duodenum	"	12.9
Small intestine	"	13.6
Colon	"	22.4
Stomach (all layers)	human	78.8
Mucous layer of the stomach	"	94.0
Placenta	"	3.3
Amniotic membrane	"	3.3
Umbilical cord	"	0.9

such as glutathione or ascorbic acid, in the tissues. The lipolytic action of gastric lipase in hogs and oxen is not so strong as that of pancreas-lipase or liver-esterase, as described by R. Willstätter; but it has been found that the lipolytic action of gastric lipase in rabbits and humans is very strong, and exists mainly in the mucous membrane of the stomach (Tables I, II, III). The blood-lipase in

TABLE II.

The action of liver-, pancreas-, stomach- and kidney-esterase in various animals.

Animal	Organ	Degree of hydrolysis in %		
		Olive oil	Tributyrin	Methylbutyrate
Hog	Liver	1.3	55.5	46.9
	Pancreas	24.8	77.1	47.5
	Stomach	0.3	7.7	5.6
Ox	Liver	1.0	28.5	23.8
	Pancreas	26.1	48.9	30.0
	Stomach	1.0	3.6	0.3
Rabbit	Liver	1.0	29.1	23.4
	Kidney	2.0	25.5	14.3
	Stomach	1.9	94.1	48.6
Hen	Liver	0.5	27.3	21.9
	Kidney	1.0	25.7	18.6
	Stomach	0.6	9.2	3.5

TABLE III.

The action of esterase in the human stomach.

No.	Portion	Degree of hydrolysis in % (Tributyrin)
I	all layers	78.78
II	"	66.69
III	"	49.14
IV	"	79.56
V	mucous layers	93.99

TABLE IV.

The action of esterase in whole blood, in serum and in erythrocyte in oxen and rabbits.

	Degree of hydrolysis in %					
	Olive oil		Tributyryn		Methylbutyrate	
	Ox	Rabbit	Ox	Rabbit	Ox	Rabbit
Whole blood	0	0.7	4.4	10.2	3.0	5.9
Serum	0	1.4	3.2	17.6	1.2	10.1
Erythrocyte	0	0.3	7.5	5.9	6.9	4.3

TABLE V.

The action of esterase in each portion of ox brain.

Portion	Degree of hydrolysis in %	
	Tributyryn	Methylbutyrate
Grey matter of cerebrum	11.9	7.8
Medullary portion of cerebrum	10.7	7.5
Cerebellum	12.1	8.4
Medulla oblongata	10.1	6.8
Spinal cord	9.1	6.6

TABLE VI.

Comparison of the tributyrin splitting action of blood-lipase in the blood of healthy and cancerous patients.

No.	Healthy N/20 KOH titration cc.	Cancerous	N/20 KOH titration cc.
1	2.91	carcinoma ventriculi	2.08
2	3.01	"	2.06
3	2.85	"	2.53
4	3.71	"	2.19
5	2.81	"	2.91
Average	3.06	"	2.45
		"	2.56
		"	2.14
		"	2.11
		carcinoma recti	2.59
		carcinoma pulmonum	2.04

oxen exists in erythrocyte, and in rabbits, it exists mainly in serum (Table IV). Brain-lipase in the same in activity in each portion of the brain (Table V). Blood-lipase from patients suffering from progressive cancer was reduced in activity more than the blood-esterase of healthy humans. (Table VI).

SUMMARY.

1. A simple alkali-titrating method for the determination of tissue esterase action, which can applied to the study of tissue esterase, has been described.

2. The lipolytic action of esterase measured by this method in various tissues has been described. The lipolytic action of esterase in the tissues depends upon the natural content of reducing substances, such as glutathione or ascorbic acid, in the tissues.

3. The lipolytic action of gastric lipase in hogs and oxen is not so strong as that of pancreas-lipase or liver-esterase, but it has been found that the lipolytic action of gastric lipase in rabbits and humans is very strong and that it exists in the mucous membranes of the stomach.

4. The blood-lipase in oxen exists mainly in erythrocyte; and in rabbits it exists mainly in serum.

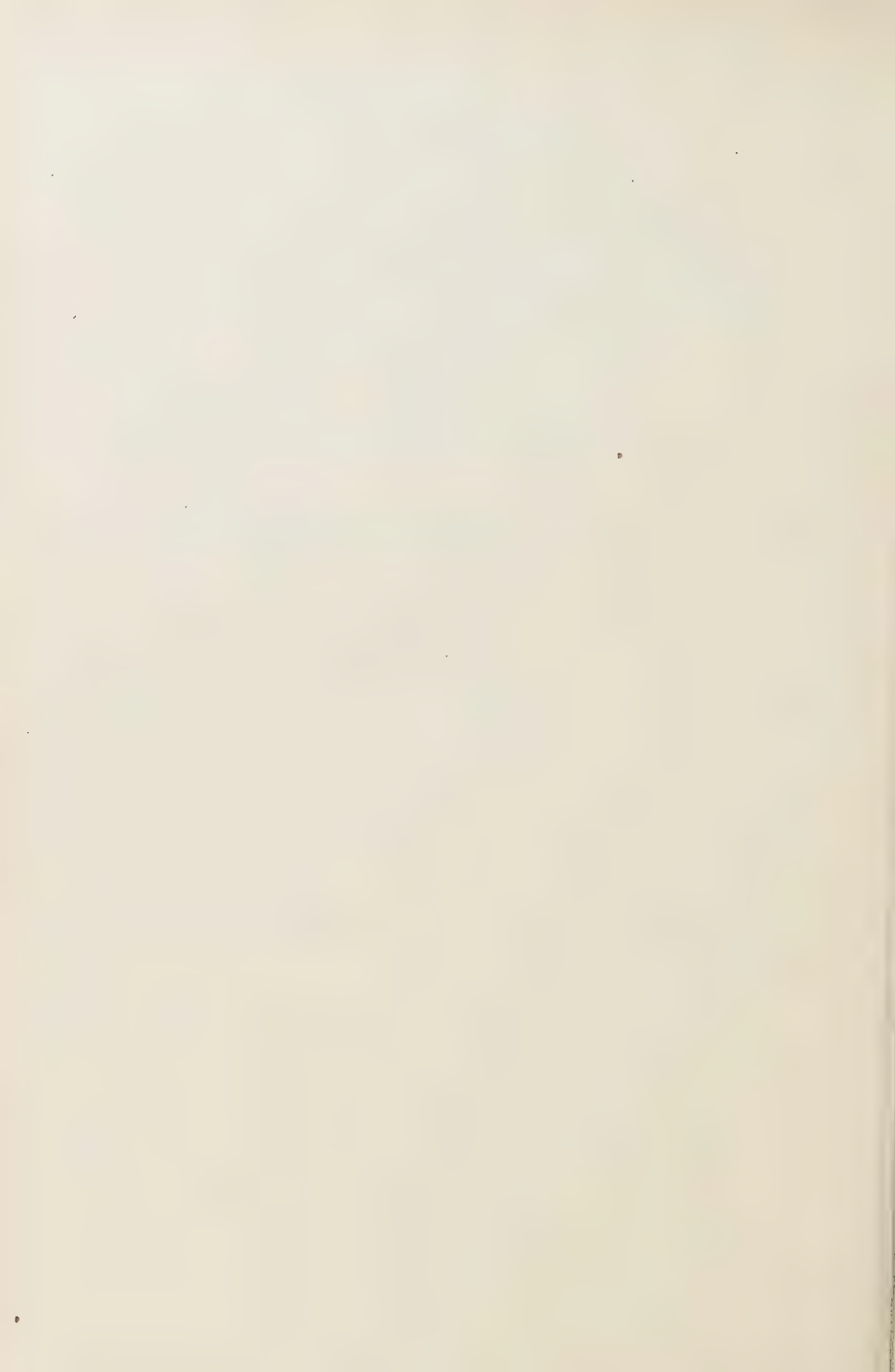
5. Brain-lipase is the same in activity in each portion of the brain.

6. Blood-lipase from the blood of patients suffering from progressive cancer was reduced more in activity than the blood-esterase of healthy humans.

The authors are greatly indebted to Prof. K. Kodama for his kind criticisms and suggestions throughout this research.

REFERENCES

- Rona, P. and Michaelis, L. (1911): *Bioch. Z.*, **31**, 345.



ÜBER α -u.- β -3-KETO-7-OXYCHOLANSÄURE.

VON

SHIGEKI MIYAZI UND HIDEO ISAKA.

(Aus dem Biochemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 14. Juni, 1939)

Durch Untersuchungen von Iwasaki (1936) ist bekannt geworden, dass die Ursodesoxycholsäure aus Bären-galle eine epimere Form der HO-Gruppe in der Stellung an C₇ von Chenodesoxycholsäure ist und dass daher die beiden Säuren bei der Oxydation mit Chromsäure ganz gleiche 3.7-Diketo-cholansäure liefern, die für die Identifizierung der Chenodesoxycholsäure benutzt wird. Somit ist es nicht ohne Bedeutung einige krystallisierbare Derivate der Chenodesoxycholsäure sowie der Ursodesoxycholsäure herzustellen, um die beiden Säuren genau von einander unterscheiden zu können.

Nur die Diformylchenodesoxycholsäure wurde bereits von Wieland (1924) angegeben. Der Formylester nach Wieland schmilzt bei 172°, der unsrige dagegen bei 184°. Der Acetylesther ist bei Wieland nicht angegeben, unserer schmilzt bei 230°. Diese beiden Ester der Ursodesoxycholsäure wurden auch von Kazi-ro (1929, 1931) und Iwasaki (1936) bereitet und es wurde festgestellt, dass sie von denen der Chenodesoxycholsäure ganz verschieden sind.

Nach Wieland u. Kapitel (1932) sollen die Acetylgruppen des Triacetylesters der Cholsäure in folgender absteigenden Reihe: an C₃, C₇ u. C₁₂ leichter hydrolytisch abgespalten werden.

Gemäss dieser Regel wurden durch partielle Hydrolyse aus Diformylcheno- u. Diformylursodesoxycholsäure zwei verschiedene Oxyformylcholsäuren α - und β -3-oxy-7-formylcholsäuren gewonnen, aus denen durch hintereinander folgende Oxydation und Hydrolyse α - und β -3-Keto-7-oxy-cholansäure (I u. II) erhalten

Wenn dieser Vorgang im Organismus stattfindet, so könnten ausser Cheno- u. Ursodesoxycholsäure β -3- α -7-Dioxycholsäure und β -3,7-Dioxycholsäure (β -Chenodesoxycholsäure) gebildet werden, deren zwei OH-Gruppen in Cis-Stellung zueinander stehen und gegenüber der Chenodesoxycholsäure als β -Konfiguration bezeichnet werden.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

1. *Chenodesoxycholsäure.**Diacetylchenodesoxycholsäure.*

2 g Chenodesoxycholsäure wurden in 2 ccm Pyridin und 2 ccm Essigsäureanhydrid gelöst und in Zimmertemperatur einen Tag stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde in viel Eiswasser eingegossen, mit einem Glasstab gut umgerührt, abgesaugt und der Rückstand mit erneutem Eiswasser einige Male gewaschen. Dieser Rückstand wurde nach dem Trocknen auf der Tonplatte aus Essigester wiederholt und dann aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Baumästertiger Krystall vom Schmelzpunkt 230°. Ausbeute 50%. Liebermannsche Reaktion: rosarot-violettrot-schmutzigbraun.

4,998 mg Subst.: 12,873 mg CO₂, 4,455 mg H₂O.

C ₂₈ H ₄₄ O ₆	Ber.	C 70,53	H 9,31
	Gef.	„ 70,25	„ 9,97.

Methylester.

Diacetylchenodesoxycholsäure wurde in üblicher Weise mit Diazomethan verestert. Der aus Methanol umkrystallisierte Ester schmilzt bei 128°.

Diformylchenodesoxycholsäure.

3,7 g Chenodesoxycholsäure wurde in 3,5 ccm absoluter Ameisensäure auf dem siedenden Wasserbade 3 Stunden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Reaktionsgemisch im Vakuumexsiccator von überschüssiger Ameisensäure befreit, wobei es zu einem Krystallbrei erstarrte. Der Krystallbrei wurde in einer kleinen Menge von Äther digeriert und abgesaugt. Der Rückstand wurde nach dem Trocknen aus Essigester mehrmals umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 184°. Ausbeute 70%.

5,195 mg Subst.: 13,160 mg CO₂, 4,050 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₀ O ₆	Ber.	C 69,59	H 8,99
	Gef.	„ 69,09	„ 8,72.

Methylester.

Diformylchenodesoxycholsäure wurde in üblicher Weise mit

Diazomethan verestert. Der aus Methanol in Nadeln krystallisierte Ester schmilzt unscharf bei 56–86°

4,115, 4,245 mg	Subst.:	10,610, 10,910 mg	CO ₂ ,	3,365, 3,450 mg	H ₂ O.
C ₂₇ H ₄₂ O ₆	Ber.	C 70,08		H 9,15	
	Gef.	" 70,32, 70,09		" 9,15, 9,09.	

3-Oxy-7-formyl-cholansäure.

2 g Diformylchenodesoxycholsäure wurde in etwaigem Überschuss einer $n/2$ NaOH-Lösung, 20 ccm gelöst und 4 Stunden lang in Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und abgesaugt.

Die Fällung wurde nach dem Trocknen aus Essigester umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 147–149°. Ausbeute 70%.

3,705 mg	Subst.:	9,610 mg	CO ₂ ,	3,180 mg	H ₂ O.
C ₂₅ H ₄₀ O ₅	Ber.	C 71,37		H 9,59	
	Gef.	" 70,74		" 9,60.	

3-Keto-7-formylcholansäure.

1 g 3-Oxy-7-formylcholansäure wurde in 10 ccm Eisessig gelöst, mit 2 ccm einer 10% igen Eisessigchromsäurelösung tropfenweise versetzt und 5 Stunden lang stehen gelassen. Durch Zusatz von Wasser und Reiben mit Glasstab wurden aus der Lösung Krystalle von glänzenden Schuppen abgeschieden. Diese Krystalle wurden aus Eisessig umkrystallisiert. Schmelzpunkt 188–189°. Ausbeute 60%.

4,320, 3,650 mg	Subst.:	11,335, 9,565 mg	CO ₂ ,	3,510, 2,925 mg	H ₂ O.
C ₂₅ H ₃₈ O ₅	Ber.	C 71,71		H 9,15	
	Gef.	" 71,56, 71,47		" 9,09, 8,97.	

3-Keto-7-orycholansäure.

0,5 g 3-Keto-7-formylcholansäure wurde mit einer 5%igen alkoholischen Kalilauge 2 Stunden lang verseift. Die Lösung wurde nach dem Abdampfen des Alkohols unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert. Der Ätherauszug wurde nach dreimaligem Waschen mit Wasser von Äther befreit, der ölige, harzige Rückstand in Essigäther digeriert und aus demselben mehrmals umkrystallisiert. Breite kurze Nadeln vom Schmelzpunkt

96°. Ausbeute 40%.

3,540 mg Subst.: 9,130 mg CO_2 , 3,100 mg H_2O .

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Ber.	C 70,53	H 9,88
	Gef.	" 70,34	" 9,80.

2. Ursodesoxycholsäure.

3-Oxy-7-formyl-cholansäure.

5 g Diformylursodesoxycholsäure vom Schmelzpunkt 170°, die nach Iwasaki (1936) hergestellt wurde, wurde in 50 cem $n/2$ NaOH-Lösung gelöst und 5 Stunden lang stehen gelassen. Die Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die Fällung nach dem Trocknen erst aus Essigester, dann aus Essigester-Petroläther umkrystallisiert. Glänzende breite Nadeln vom Schmelzpunkt 135°. Ausbeute 60%.

3,630, 3,400 mg Subst.: 9,480, 8,890 mg CO_2 , 3,075, 2,950 mg H_2O .

$\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_5$	Ber.	C 71,37	H 9,59
	Gef.	" 71,23, 71,31	" 9,48, 9,71.

3-Keto-7-formylcholansäure.

2 g 3-Oxy-7-formylcholansäure wurde in Eisessig gelöst, mit einer 10% igen Eisessigchromsäurelösung tropfenweise versetzt und 3 Stunden lang in Zimmertemperatur stehen gelassen. Das durch Zusatz von Wasser ausgefällte Öl wurde in Äther aufgenommen. Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser von Äther befreit. Der dabei erhaltene ölige Rückstand ist wohl sehr schwer krystallisierbar, aber es gelingt ihn krystallinisch zu erhalten, wenn er in 20% iger Ameisensäurelösung heiss gelöst wird, wobei sich der ölige Teil auf dem Boden des Gefäßes absetzt, und der obere klare Teil abdekantiert und unter Zusatz von Wasser stehen gelassen wird.

Der ölige Teil wurde durch Wiederholung dieser Behandlung in Krystallform gebracht. Die vereinigten Krystalle wurden aus Alkohol-Wasser mehrmals umkrystallisiert. Glänzende breite Blättchen vom Schmelzpunkt 126–129°. Ausbeute 40%.

3,600, 3,360 mg Subst.: 9,450, 8,850 mg CO_2 , 2,870, 2,750 mg H_2O .

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_5$	Ber.	C 71,71	H 9,15
	Gef.	" 71,59, 71,83	" 8,92, 9,16,

3-Keto-7-oxycholansäure.

0,7 g 3-Keto-7-formylcholansäure wurde in 5% iger Kalilauge gelöst und in Zimmertemperatur 3 Tage lang stehen gelassen. Die Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die Fällung in verdünntem Alkohol gelöst, wobei sich eine gelblich verfärbte ölige Masse auf dem Boden des Gefäßes absetzte. Nach dem Dekantieren des oberen klaren Teils krystallisierte die ölige Masse durch Zusatz von Wasser teilweise. Diese Behandlung wurde wiederholt, um die ölige Masse krystallinisch zu erhalten. Der auf diese Weise gewonnene Krystall wurde aus Alkohol-Wasser mehrmals umkrystallisiert. Glänzende federartig angeordnete Blättchen vom Schmelzpunkt 115–117°. Ausbeute 30%. Liebermann-reaktion: violettrot.

Spec. Drehung: 58,2 mg Subst. in 5 ccm Alkohol, 1 dm, $\alpha = +0,11$,
 $[\alpha]_D^{110} = +6,45^\circ$.

3,225, 3,470 mg Subst.: 8,720, 9,375 mg CO₂, 2,900, 3,060 mg H₂O.

C₂₄H₃₈O₄ Ber. C 73,78 H 9,81

Gef. " 73,74, 73,68, " 10,06, 9,87.

LITERATUR

- Fernholz, E. (1935): Z. Physiol. Chem., **232**, 202.
 Imai, I. (1937): " , **248**, 65.
 Iwasaki, T. (1936): " , **244**, 181.
 Kim, C. H. (1939): " , **260**, Heft 5/6.
 Kaziro, K. (1929/31): " , **185**, 151 u. **197**, 206.
 Kyogoku, K. (1937): Z. Physiol. Chem., **246**, 99.
 Ohta, K. (1939): " , **259**, 53.
 Sugiyama, G. (1937): Jl. of Bioch., **25**, 157.
 Wieland, H. u. Kapitel, W. (1932): Z. Physiol. Chem., **212**, 269.
 Wieland, H. u. Kishi, S. (1933): Z. Physiol. Chem., **214**, 47.
 Wieland, H. u. Revere, G. (1924): " , **140**, 186.

BEITRÄGE ZUM WACHSTUMSPHÄNOMEN DES SEIDENSPINNERS.

Die verschiedenen aufbauenden und katalytischen Elemente und deren biologische Bedeutung während des Wachstums.*

VON

AKIRA AKAO.

*(Chemische Abteilung des Japanischen Kaiserlichen Institutes
für Seidenkultur, Tokyo, Japan.)*

(Eingegangen am 15. Juni 1939)

EINLEITUNG.

Schon in der früheren Mitteilung (Akao 1932 b) wurde ausführlich erwähnt, dass es nicht an biochemischen Arbeiten über das Wachstum der Insekten fehlt. Durch jene Veröffentlichungen wurde die biochemische Bedeutung des Insektenwachstums besonders hervorgehoben.

Wegen der vielfachen Beziehungen der Insekten zum menschlichen Leben behandelte man sie aber grösstenteils vom Standpunkt der angewandten Zoologie. Dadurch wurde das biochemische Geschehen der Insekten, insbesondere des Seidenspinners während des ganzen Lebens, nur wenig studiert.

Weil die Insekten, die als Objekt für das Studium des Wachstums sehr geeignet sind, in ihrem biologischen Verhalten durch den ökologischen Zustand leicht beeinflusst werden können, muss in der Insektenbiochemie eine systematische Arbeitsmethode, die

* Herr Prof. Dr. Hiroshi Nakamura, der Chef der biochemischen Abteilung der kaiserlichen Universität zu Keijo Japan, wo die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, sei herzlichst gedankt für seine freundliche Anregung.

Ogleich diese Arbeit schon im Juni 1935 fertig gestellt worden ist, wurde ihre Veröffentlichung durch eine 2 jährige Auslandsreise des Verfassers verzögert.

das äussere Medium so gut wie möglich ausschliesst, eingeführt werden. Die Schwierigkeiten, das innere Medium der Insekten vom äusseren zu unterscheiden, müssen in Kauf genommen werden. Derartige Vorschläge machte auch schon B.P. Uvarov (1928) in seinem umfassenden Sammelreferat.

Mit Hilfe der heutigen chemischen Kenntnisse ist es schwer, alle Wachstumskurven im Zusammenhang mit dem stofflichen Aufbau der Organismen zu erfassen. Man kann aber die entsprechende Wachstumskurve der einzelnen Stoffe, wie z. B. die C-Wachstumskurve, als solche verstehen, wenn man sie mit der Gewichtskurve des gleichen Organismus unter den gleichen Bedingungen zusammen betrachtet. Die Summe der einzelnen Wachstumskurven musste dann mit der Gewichtskurve der betreffenden Organismen übereinstimmen, wenn man die realen Werte der chemischen Zusammensetzung erfasste.

Aus diesen Überlegungen will ich jetzt in vorliegender Mitteilung nicht nur die verschiedenen aufbauenden Elemente C, H, Na, K, Ca, Mg, die in der früheren Mitteilung nicht behandelt worden sind, sondern auch die katalytischen Elemente Fe, Zn, Mn, Cu*

* Es gibt schon mehrere Untersuchungen über die katalytischen Elemente der Insekten resp. des Seidenspinners.

Fe: Unter verschiedenen katalytischen Elementen ist das Eisen das Element, das ausnahmslos in allen Insektenarten gefunden wird. Über den Gehalt dieses Elementes wurde bei folgenden Insektenarten berichtet.

Diptera: Chironomidae; Hymenoptera: Biene; Coleoptera: Melolontha; Lepidoptera: Bombyx mori, Deilephila euphorbiae; Hemiptera: Agonoscelis versicolor; Odonata: Zygoptera; Orthoptera: Schistocerca paranensis, Schistocerca gregaria, Melanoplus, Acanthacris ruficornis, Oxya velox.

Ausserdem hat Griffiths (1892) in seiner klassischen Arbeit den Eisengehalt in der Hämolymphe von mehreren Arten der Lepidoptera und Coleoptera angegeben. Ein spezifisches Pigment, Cytochrom, entdeckte Keilin (1925) in verschiedenen Insekten, dieses spielt als ein intrazellulärer Respirationskatalysator eine wichtige Rolle.

Zn: Über den Zinkgehalt der Insekten wurde bis jetzt nur von wenigen Autoren Aronsohn (1911), Délézenne (1919), Akao (1935) berichtet und nur bei folgenden Insektenarten wurde er angegeben.

Diptera: Musca domestica; Hymenoptera: Biene; Coleoptera: Carabus aureus; Lepidoptera: Bombyx mori.

mit in den Kreis der Beobachtungen ziehen. Es ist zu erwarten, dass durch eine derartige Betrachtungsweise die Wachstumsphänomene der Insekten viel leichter erklärt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Reinblütige Raupen und Hybriden, die aus zu gleicher Zeit gelegten Eiern an demselben Tage auskrochen, wurden unter gleichen Bedingungen gezüchtet.¹⁾

Zur Untersuchung von Trockensubstanz, resp. Wassergehalt sowie Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt wurden dieselben Gruppen (am 1/IX 1931 ausgekrochene Hybriden, japanische Rasse 107× (chinesische Rasse 101×chinesische Rasse 9)), die in meiner Mitteilung (Akao 1932 b) zur Untersuchung von den Gewichts-, Stickstoff-, Phosphor-, Purinbasen- und Harnsäure-

Mit Hilfe der Spektroskopie fand Haber (1926) das Zink sowie auch Eisen, Kupfer und Mangan qualitativ in einem Orthoptera, *Blattella germanica*.

Mn: Das Mangan wurde in ziemlich vielen Insektenarten, wie folgt, untersucht.

Hymenoptera: Biene, Formicidae; Coleoptera: Cyrtinus natator; Lepidoptera: Pieris brassicae, Chelonia caja, Chelonia villica, Bombyx mori; Hemiptera: Agonoscelis vesicolor; Orthoptera: Locusta viridissima, Melanoplus, Schistocerca gregaria, Oryza velox.

Cu: Muttkowski (1921) hat das Kupfer in verschiedenen von ihm untersuchten 34 Insektenarten ausnahmslos gefunden und hat seinerzeit eine Hypothese aufgestellt, dass das Kupfer den Kern des respiratorischen Bluteiweisses der Insekten, Hämocyanins, sein mag, obwohl niemand sie seitdem mit positivem Beweis unterstützen konnte. Ausserdem wurde das Kupfer in folgenden Insektenarten quantitativ bestimmt.

Diptera: Gastrophilus nasalis, Gastroph. intestinalis, Cynomyia cada-verina, Sacrophaga, Musca domestica; Hymenoptera: Biene; Coleoptera: Anomala vitis, Trilobolium confusum, Bruchus obtectus; Lepidoptera: Ephestia kuehniella, Samia cecropia, Bombyx mori; Hemiptera: Agonoscelis versicolor; Orthoptera: Blatta orientalis, Periplaneta americana, Melanoplus femur-rubrum, Schistocerca gregaria, Acanthacris ruficornis, Oryza velox.

Die Kenntnisse über die physiologische Bedeutungen des einzelnen katalytischen Elementes der Insekten sind noch lückenhaft, aber es steht ausser Frage, dass die katalytischen Elemente sich in konstanten Verhältnissen im Organismus zeigen, wenn sie mit Hilfe feiner Bestimmungsmethoden untersucht werden.

wachstumskurven gedient hatten, herangezogen.

Material zur Aschenanalyse lieferten die japanischen reinblütigen 107, die am 18/V 1932 ausgekrochen sind. Ausserdem wurden die Seidenspinnereier,²⁾ (japanische Rasse 107, bivoltine Eier), die am 2/VII 1932 gelegt wurden, am nächsten Tage als Material gebraucht.

Von der 3. Ecdysis ab wurden die Larven nach beiden Geschlechtern getrennt gezüchtet. Um die Einflüsse äusserer Bedingungen, wie sie z. B. durch im Verdauungskanal zurückgebliebene Maulbeerblätterstückchen hervorgerufen werden oder sonstwie durch den Kot erkannt werden, genauer zu prüfen, wurden die Larven in jeder Wachstumsstufe in folgender Einteilung untersucht: 1) Larven nach der Häutung (noch nicht gefüttert), 2) Larven während energischen Fressens, 3) Larven während des Schlafs. Die enthäuteten und noch nicht gefütterten Larven sind praktisch von Maulbeerblättern frei, sie stehen deshalb dem inneren Medium des Organismus nah.

Alles Untersuchungsmaterial wurde in der Seidenspinnerzuchtstation in Keijo, Provinz Keikido, Chosen, mit besonderer Sorgfalt von den Herren Karasawa und Kiriyama u. A. gezüchtet.

Es ist mir auch an dieser Stelle eine angenehme Pflicht, Herrn Dr. Y. Umeya, dem damaligen Chef jener Station, und den Herren Karasawa und Kiriyama aufs herzlichste für ihre stete, freundliche Hilfe zu danken.

Bestimmung des Frischgewichtes und des Trockengewichtes.

1) Zur Bestimmung der katalytischen Elemente wurden die Raupen so gezüchtet, dass sie nicht mit Metallteilen in Berührung kommen konnten. Dadurch sollte von vornherein jede Verunreinigung ausgeschaltet werden. Zu diesem Zwecke wurde jede spinnreife Raupe in eine saubere paraffinierte Papiertüte gelegt, damit sie hier einen staubfreien Kokon spinnen könnte.

2) Für die Gewinnung derartig grosser Mengen Seidenspinnereier in staubfreiem Zustand wurde die bewährte Methode, die ich bei der Untersuchung der Seidenspinnereier (Akao 1932 a) schon gebraucht hatte, wieder angewandt. Die Eier lässt man auf die Oberfläche einer völlig metallfrei gemachten breiten, elastischen Gummiplatte, legen und durch einfaches Ausspannen der Gummiplatte lässt man später die Eier hinunterfallen.

Das gesamte Untersuchungsmaterial wurde zuerst ausgezählt und frisch gewogen und dann für den Transport in das Institut unter metallfreien, destillierten Alkohol gebracht. Um die Fehlergrenze bei der Bestimmung des Gewichtsverlustes so klein wie möglich zu halten, wurden die Eier oder die frisch ausgekrochenen Raupen erst nach dem Abtöten in Alkohol ausgezählt. Das in Alkohol aufbewahrte Material wurde mit einer völlig vernickelten Schere zerschnitten und nach dem Verdampfen des alkoholischen Mediums auf dem Trockenschrank bei 95°C bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Kokons wurden von den Puppen getrennt getrocknet und gewogen.

Der Wassergehalt wurde wie üblich durch die Differenz aus Frischgewicht und Trockengewicht ermittelt.

Bestimmung des Kohlen- und Wasserstoffs.

Der Kohlenstoff- und der Wasserstoffgehalt wurden durch Verbrennung bestimmt. Die erhaltenen Werte hängen natürlich vom Homogenitätsgrad der zu prüfenden Substanz ab. Da aber die mechanisch zerkleinerte Masse für die Makroanalyse praktisch fein genug ist, ist mit Sicherheit anzunehmen, dass diese Resultate die Kohlen- resp. Wasserstoffwerte des Individuums mit best-möglicher Genauigkeit wiedergeben.¹⁾

Bestimmung des Aschengehaltes.

Die getrocknete Masse wurde zuerst mild im Gas-Mouffelo-fen verkohlt, um den Verlust flüchtiger Metalle zu vermeiden. Nach dem Abfiltrieren des in stark verdünnter HCl löslichen Anteils wurde der Rückstand auf dem aschenfreien Berzeliusfilter No. 00 weiter unter Zusatz einiger Tropfen verdünntern H₂SO₄ vorsichtig verascht. Die vollkommen veraschte Masse wurde dann mit dem in verdünnter HCl gelösten Anteil vereinigt und auf dem Wasserbade, das zum Schutz gegen Verunreinigungen mit einem Porzel-

* Bezüglich des Homogenitätsgrades und der Teilchengröße sei auf die Arbeiten der Herren Dr. Ryo, Dr. Kuroda, Asano, Ichinosawa, Hiraoka und Watanabe (1934) hingewiesen, die sich theoretisch und praktisch mit dem biologischen Material befassen.

landeckel versehen ist, eingedampft. Die gesamte Asche wurde zuletzt als Sulfat gewogen. Alle Reagenzien, Wasser, Säuren und Utensilien, die mit dem Versuchsmaterial in Berührung kamen, wurden kurz vor dem Gebrauch schwermetallfrei gereinigt. Um die Fehlergrenze, die nicht homogenes Material verursacht, soweit wie möglich herabzusetzen, wurden ziemlich grosse Mengen Material auf einmal verascht, und nach dem Auffüllen mit HCl zu einem bestimmten Volumen wurde der aliquote Teil weiterverarbeitet.

Bestimmung des Natriums.

Natrium wurde als Pyroantimonat gefällt. Die Reduktionskraft der durch die überschüssigen H-ionen freigewordenen Antimon-ionen wurde jodometrisch bestimmt. (B. Kramer und I. Gittleman 1924).

Bestimmung des Kaliums.

Nach der Angabe von D. J. Perietzeanu (1926) wurde das Kalium in der Asche gravimetrisch als K-perchlorat bestimmt.

Bestimmung des Calciums und Magnesiums.

Nach der Vorschrift von M. Ch. O. Guillaumin (1932) wurde das Calcium als Ca-Oxalat gefällt und als CaO gravimetrisch bestimmt. Das Magnesium wurde aus der vom Ca-ion befreiten Lösung nach Schmidt (1906) gefällt und Mg als $Mg_2P_2O_7$ gravimetrisch bestimmt.

Bestimmung des Eisens.

Das Eisen wurde quantitativ als $FePO_4$ abzentrifugiert und als Berliner-Blau kolorimetrisch bestimmt (L. Maquenne 1921).

Bestimmung des Zinks.

Das Zink wurde nach der durch Herrn Dr. A. Koga (1934) modifizierten polarographischen Methode bestimmt. Die salzsaure Aschenlösung wurde mit schwermetallfrei gereinigtem Ammoniak neutralisiert und dann weiter bis zu einem Gehalt von 5% mit Ammoniak versetzt. Die dabei entstandene Fällung wurde abfiltriert und wieder in HCl gelöst und dann nochmals mit

Ammoniak wie oben gefällt. Das zweite Filtrat wurde mit dem ersten vereinigt und auf dem Wasserbade eingedampft. Der Rückstand wurde mit *n.* NaOH in bestimmtem Volumen gelöst und abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde polarographisch analysiert. Die Standardlösungen wurden natürlich auch nach der oben angegebenen Vorschrift behandelt.

Bestimmung des Mangans.

Nach der Angabe von G. Bertrand (1911) wurde das Mangan aus der schwefelsauren Asche in schwach salpetersaurer Lösung (schwermetallfreie, frisch gereinigtes HNO_3) mit Hilfe von Silbernitrat und Kaliumpersulfatpulver zu Permangansäure oxydiert. Das Mangan wurde dann mit den wie oben behandelten Standardlösungen kolorimetrisch bestimmt.

Bestimmung des Kupfers.

Zur Bestimmung des Kupfers im biologischen Material¹⁾ werden ganz verschiedene Methoden angegeben: kolorimetrisch, volumetrisch (nach Warburg), elektrolytisch, mikrogravimetrisch, polarographisch, spektrographisch, potentiometrisch, photoelektrisch etc.

Wenn man das biologische Material direkt zur quantitativen Bestimmung des Kupfers anwendet, gibt keine der oben angeführten Methoden einwandfreie Resultate. Zur Vorbehandlung des biologischen Materials haben sich nun zwei Methoden bewährt. Das Kupfer wird 1) entweder als CuS -Fällung oder 2) mit Hilfe der Elektrolyse von anderen Aschenbestandteilen getrennt.

Die erstgenannte Methode ist manchmal schwierig durchzuführen, weil die minimale CuS -Fällung sich nicht immer gut absetzt (kolloidal). Bei der zweiten Methode (elektrolytischen Methode) wird die quantitative Ausscheidung des Kupfers wegen der Beimengung von verschiedenen Aschenbestandteilen in gewissen Fällen beeinträchtigt.

1) Die Literatur von Kupferbestimmungen in biologischem Material bis zum Jahre 1932–33 wurde sehr gut von T. H. Pope (1932) und Sarata (1933) zusammengestellt.

Versuche von Herrn Prof. M. Shikata (1927) ergaben tatsächlich, dass sich in elektrolytischem Medium biologischer Natur nach der Elektrolyse vernachlässigte Mengen Kupfers polarographisch nachweisen lassen. Es ist also erforderlich, dass die biologische Asche für die elektrolytische Methode vorbereitet wird. Mehrere Autoren versuchten deshalb die Substanzen, die die quantitative Ausscheidung des Kupfers aus des Reaktionssystem stören, vorher abzusecheiden. Wie aus meinen Versuchen (s. unten) hervorgeht, ist es notwendig, verschiedene Salze, besonders Ca-Salze, wegzunehmen. In dem Ca-reichen biologischen Material blieb auch die sodaalkalische Fällung erfolglos (R. Guillemet 1932). Da aber die Asche des Seidenspinners gerade an Ca und P reich ist, musste hier ein Weg gefunden werden. Aus der Modelllösung, die nur Fe- und Cu-Salz enthielt, ist es mir gelungen, die beiden Metalle quantitativ zu bestimmen. Ich habe dazu die Maquennesche Methode des Eisens und Guillemetsche Permanganatmethode des Kupfers verbunden.

TABELLE I.
Trennung des Kupfers von Eisen in der Modelllösung.

In Modelllösung		Wiedergefunden	
Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg
0.05	0.10	0.049 ⁴	0.10
"	"	0.049 ⁸	"
0.01	"	0.009 ⁹	"
"	"	0.009 ⁹	"

Wie man sieht, sind die Ergebnisse befriedigend. Diese Modifikation wurde dann direkt auf die biologische Asche übertragen. Zwar liess sich hier das Eisen vollkommen quantitativ, das Kupfer aber nicht mehr quantitativ ermitteln. Es konnte weder nach der Elektrolyse auch in dem Medium nachgewiesen werden. Daraufhin wurden verschiedene Methoden zum Wegnehmen des Hauptteils der bei der elektrolytischen Ausscheidung des Kupfers störend wirkenden Salze gesucht und geprüft. Die folgende Trennungs-

methode hat sich dabei sehr gut bewährt.

Ausführung der Kupferbestimmung in biologischem Material.

Die salzsaure Aschenlösung wird mit 1 ccm 10%iger Schwefelsäure (schwermetallfrei, frisch destilliert) versetzt und auf dem Wasserbade eingedampft. Der Rückstand wird quantitativ in das Spritzglas umgegossen. Nach dem Zusatz von mehreren Tropfen der Na_2HPO_4 -Lösung neutralisiert man mit Ammoniak (schwermetallfrei) mit Phenolphthalein als Indikator. Das Volumen der ganzen Lösung soll nicht über 3 ccm betragen.

Nun wird die neutralisierte Lösung mit 1 ccm verdünnter Essigsäure versetzt, zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit so gut wie möglich abpipettiert. Der Bodensatz wird wieder in verdünnter HCl gelöst. Das Eisen in der HCl -Lösung wird wie oben erwähnt behandelt.

Um die an den Eisenphosphat-Niederschlag adsorbierten Cu-Ionen wegzuwaschen, wird der Niederschlag noch einmal wie oben behandelt. Der letzte Bodensatz wird zur Analyse des Eisens gebraucht.

Jede überstehende Flüssigkeit wird vereinigt, mit Ammoniak neutralisiert und weiter auf einen Gehalt von 5% Ammoniak gebracht. Nach dem Stehenlassen zentrifugiert man und hebert die überstehende Flüssigkeit genau ab.

Der Bodensatz wird zum Zwecke des Waschens wieder in HCl gelöst um dann wie oben in 5% Ammoniaklösung wieder zu fällen. Beide überstehende Flüssigkeiten werden vereinigt, auf dem Wasserbade eingedampft und mild verascht, um NH_4Cl zu vertreiben. Der Rückstand in der Schale wird dann mit Wasser, das mit einigen Tropfen konz. H_2SO_4 angesäuert ist, gelöst; die dabei entstehende minimale Flockung zentrifugiert man ab. Danach wird die Lösung zur Elektrolyse bis auf etwa 3 ccm eingedampft. Nach der Angabe von Maquenne und Demoussy (1919) dient eine Platinplatte von 2×10 mm als Elektrode und ein Strom von 7 Milliampère wird 12 Stunden lang durchgeleitet.

Nach der Elektrolyse wird die Elektrode in 3 ccm kaltes

Molybdenreagens, das nach der Vorschrift von Guillemet (1932) hergestellt worden ist, eingetaucht, ohne dass der Strom unterbrochen wird. Nach kurzem Stehen im Dunklen—einige Minuten lang—wird das überschüssige Molybdat mit 0.005%iger Kaliumpermanganatlösung mit Benzidinazetat als Indikator titriert.

Das ausgeschiedene Kupfer wird nach der folgenden Gleichung errechnet:

$$1 \text{ ccm } 0.005\% \text{ KMnO}_4 \dots\dots 0.05 \text{ mg Cu.}$$

Aus dieser Tabelle lässt sich klar erkennen, dass diese Methode verlässliche Werte von Cu in biologischem Material gibt. Nach dieser Kupferbestimmung lässt sich im Elektrolysenmedium kein polarographisch bestimmbares Kupfer mehr nachweisen.

TABELLE II.

Quantitative Bestimmung des Kupfers und Eisens in dem biologischen Material.

		Material	Gefunden	
			Cu mg	Fe mg
1	Asche (5.6976 g) der 800 männl. Seidenspinner-schmetterlinge nach der Kopulation.	1/10 dieser Asche	0.111	0.625
		"	0.118	"
		" + 0.01 mg Cu	0.128	"
2	Asche (2.0966 g) der weibl. Puppenhaemolymphe vom 2. Tag des Puppenstadiums.	1/10 dieser Asche	0.025	0.047
		"	0.026	"
		"	0.025	"
		"	0.024	"
		" + 0.01 mg Cu	0.035	"
		3/100 dieser Asche*	0.014 (also in 1/10 dieser Asche 0.047 mg Fe)	

* Direkt nach der Originalmethode von Maquenne (1921).

1) Nachdem ich diese Methode so abgeändert hatte, habe ich zufälligerweise eine ähnliche Arbeit von Josef Krenn (Mikrochemie **23**, 147–159 1937) gefunden. Er hat auch wie ich bei der nachfolgenden Kolorimetrierung störende Kalksalze und Phosphate mittels Ammoniak im grossen Überschuss gefällt und getrennt.

VERSUCHSERGEBNISSE.

1. Änderung des Trockengehaltes während des Wachstums.

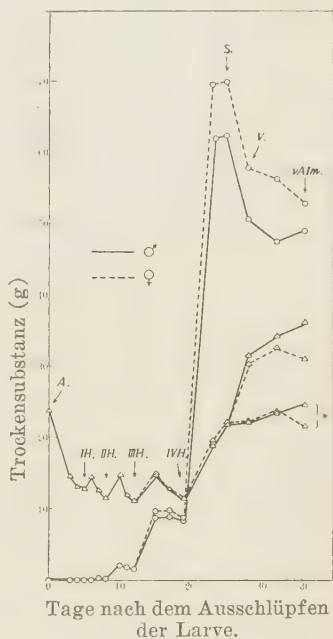
Die Trockensubstanz-Wachstumskurve (Tr-K.) hat eine grosse Ähnlichkeit mit der Gewichts-Wachstumskurve (Gw-K.); darüber berichtete ich schon in früherer Mitteilung (Akao 1932b). Es wurde damals mit demselben Material von Seidenspinners gearbeitet. Aus der Tr-K. ist zu entnehmen, dass die frisch ausgekrochene Raupe bis zur spinnreifen Raupe 6314fach bei Weibchen und 5618fach bei Männchen zunimmt.

Diese Tr-K. erreichte zur Zeit der Spinnreife ihren Gipfel, um dann bei der Verpuppung zwar steil aber mit dem Verlauf des Puppenstadiums zusammenhängend abzusinken. Das Weibchen war reicher an Trockensubstanz als das Männchen. Besonders deutlich wird dieser geschlechtliche Unterschied nach der Spinnreife.

Bei der frisch ausgekrochenen Raupe betrug der Wassergehalt 76.08% und nahm während der Fütterung und des Schlafs steil zu. Nach der 1. Häutung wurde der grösste Wassergehalt während des 1. Stadiums überschritten. In jeder

Wachstumsstufe wiederholte sich der gleiche Vorgang, während der Fütterung war der Wassergehalt am kleinsten, nahm dann während des Schlafes zu und erreichte nach der Häutung seinen Höhepunkt. Nach dem 4. Schlaf zeigen die Raupen beiden Geschlechter einen

Fig. 1.
Die Änderung des Trockensubstanzgehaltes während des Wachstums.



- . . . pro 100 Individuen.
- △ . . . pro 100g Frischgewicht.
- * . . . Puppen excl. Kokon.
- A . . . Ausgekrochene Larve.
- IH, etc. . . . I. Häutung etc.
- S . . . Spinnreife.
- V . . . Verpuppungszeit.
- vAIm . . . vor dem Ausschlüpfen des Imagos.

TABELLE

Die Änderung des Trockensubstanz- resp. Wasser-, Kohlenstoff- und

Tage nach dem Ausschlüpfen der Larve		Wachstumsstadium	Geschlecht	Material		Trockensubstanz angew. g	Wassergehalt %
				Individuen	Frischgew. g		
0	I. Wachstumsstufe	Aussgekröchen		23738	11.0000	2.6323	76.08
3		Fütterungsstad.		990	6.0011	0.8726	85.30
4		während d. Schlafs		600	3.7770	0.4924	86.97
4	II. Wachstumsstufe	nach d. Häutung		600	3.5024	0.4462	87.27
6		Fütterungsstad.		600	11.7812	1.6914	85.65
7		während d. Schlafs		400	14.3190	1.7786	88.29
8	III. Wachstumsstufe	nach d. Häutung		400	13.6938	1.5832	88.45
10		Fütterungsstad.		40	5.5480	0.8182	85.25
11		während d. Schlafs		40	6.1933	0.7364	88.13
12	IV. Wachstumsstufe	nach d. Häutung		40	6.2402	0.6922	89.23
			♀	10	6.7210	0.9750	85.49
15		Fütterungsstad.	♂	10	5.9277	0.8774	84.44
			♀	10	7.5025	0.9662	87.12
17		während d. Schlafs	♂	10	6.8475	0.8810	87.14
18	V. Wachstumsstufe	nach d. Häutung	♀	10	7.3680	0.8644	88.28
			♂	10	7.2135	0.8452	88.28
23		Maxialfütterungsstadium	♀	5	17.78	3.4815	80.43
			♂	5	16.65	3.1026	81.38
			♀	5	16.00	3.5044	78.11
24		Spinnreife	♂	5	14.17	3.1180	77.98
28	Puppenstadium	Verpuppungszeit	♀	10 a)	16.83	3.7150	(77.93)
				b)	2.32	2.0752	69.76
			♂	10 a)	13.55	2.9782	(78.00)
				b)	2.40	2.0824	68.27
32		5. Tag des Puppenstadiums	♀	9 a)	13.35	3.1712	(76.24)
				b)	2.10	1.8900	67.24
			♂	9 a)	10.51	2.4292	(76.89)
				b)	2.01	1.8522	65.80
36		9. Tag des Puppenstadiums [Vor dem Ausschlüpfen des Imagos]	♀	9 a)	13.23	2.8445	(78.51)
				b)	2.12	1.9215	68.95
			♂	9 a)	10.01	2.4340	(75.68)
				b)	2.02	1.9785	63.86

Zahlen in Klammern zeigen den Wassergehalt der Puppe im engeren Sinne

a).....Puppen exkl. Kokons.

b).....Kokon allein.

III.

Wasserstoffgehaltes während des Wachstums.

100 Tiere enthielten			pro 1 kg Frischgewicht		pro 1 kg Trockensubstanzgewicht	
Trockensubstanz g	Kohlenstoff g	Wasserstoff g	Kohlenstoff g	Wasserstoff g	Kohlenstoff g	Wasserstoff g
0.0111	0.0052	0.0008	112.33	17.73	468.44	73.94
0.0881	0.0407	0.0058	67.87	9.60	461.75	66.02
0.0821	0.0367	0.0055	58.33	8.82	447.34	67.63
0.0743	0.0327	0.0048	56.01	8.33	439.60	65.35
0.2813	0.1150	0.0187	58.58	9.54	407.91	66.46
0.4445	0.1865	0.0302	49.11	7.93	419.30	67.74
0.3958	0.1643	0.0273	47.99	8.01	415.45	69.33
2.0450	0.8345	0.1458	60.16	10.48	407.88	71.04
1.8410	0.7346	0.1314	47.40	8.46	399.34	71.29
1.7305	0.7180	0.1161	44.67	7.23	414.80	67.13
9.7500	3.9320	0.6811	58.50	10.14	403.24	69.91
8.7740	3.2646	0.6007	57.65	10.62	371.79	68.52
9.6620	3.7511	0.6814	49.99	9.05	388.15	70.26
8.8100	3.7188	0.6196	54.24	9.00	421.71	70.00
8.6440	3.5158	0.6152	74.67	8.32	406.73	70.97
8.4520	3.4949	0.5983	48.48	8.28	413.60	70.63
69.6300	30.3317	5.1105	85.19	14.36	435.32	73.39
62.0520	26.9220	4.5854	80.84	13.75	433.94	73.62
70.0880	31.1282	5.1149	104.23	16.13	476.10	73.65
62.3600	28.8647	4.6135	101.93	16.35	462.90	74.27
57.9020	26.6196	4.2965	138.43	22.00	457.76	72.76
50.6060	25.3358	3.7491	157.76	23.26	497.20	73.31
56.2356	27.3898	4.1209	157.80	23.65	481.69	72.15
47.5711	23.7160	3.5739	169.64	25.43	496.02	74.37
52.9556	25.2058	3.7254	147.60	21.70	473.89	69.89
49.0277	24.8674	3.6282	184.80	26.78	509.29	74.10

(exkl. Kokon).

Wassergehalt von 88.28%, der dann allmählich wieder abnahm; bei der spinnreifen Raupe war er auf 78.11% (Weibchen), 77.98% (Männchen) herabgesunken. Im Verlauf des Puppenstadiums nahm der Wassergehalt zwar wieder ab, aber vor dem Ausschlüpfen des Imagos nahm er beim Weibchen im Gegensatz zum Männchen wieder zu.¹⁾

Nach der Eiablage zeigte das weibliche Imago keine Änderung des Wassergehaltes (78.25%), das männliche aber verliert durch die Geschlechtstätigkeit bedeutende Mengen Wasser (Wassergehalt 66.00%).

2. Änderung des Kohlen- und Wasserstoff-Gehaltes während des Wachstums.

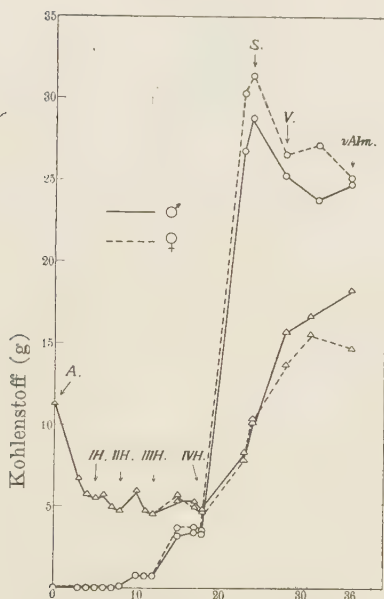
Die Kohlen- und Wasserstoff-Wachstumskurven verlaufen ähnlich wie die Tr-K.. Sie zeigen spezifische Kurven, die bei der Spinnreife ihren Gipfel erreichen und während der Verpuppung dann allmählich abfallen. (Siehe Fig. 2 u. 3.)

Beim Betrachten der Kurven, die Kohlen- und Wasserstoff Gehalt pro 100 g Körpergewicht während des ganzen Lebensverlaufs veranschaulichen, findet man einen Kohlen- und Wasserstoffgehalt der frisch ausgekrochenen Raupen von 11.233 g C resp. 1.773 g H.²⁾ Dann nehmen beide Elemente stark ab. Bei jeder Wachstumsstufe sind die C- und H-Werte während der Fütterung am grössten und nehmen während des Schlafs und nach der Häutung ab. Die C- und H-Werte, die bei der 4. Häutung ihr Minimum erreichen, werden dann immer grösser: bei spinnreifen Raupen betragen die C- und H-Werte 9.731 g C (Weibchen), 9.276 g C (Männchen) resp. 1.613 g H (Weibchen), 1.624 H (Männchen). Im Verlauf des Puppenstadium nehmen sie zu, kurze vor dem Auskriechen des Imagos nehmen sie wieder bei Weibchen im Gegensatz zum Männchen ab.

1) Weil der Kokon als Sekret am Wasserhaushalt keinen Anteil mehr hat, erscheint es richtiger, den Kokon bei der Berechnung des Wassergehaltes ausser Betracht zu lassen. (Siehe Figur 1).

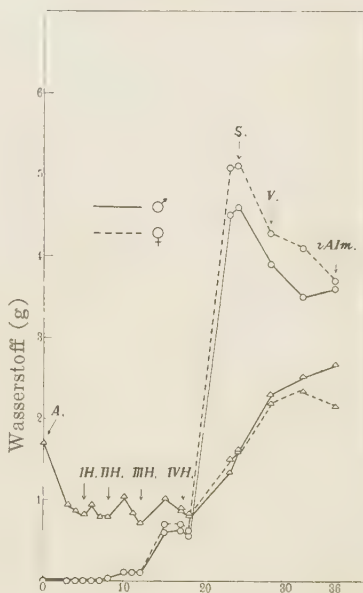
2) Jedes Element wird als solches (nicht als Oxyd) berechnet.

Fig. 2.
Die Änderung des Kohlenstoff-
gehaltes während des
Wachstums.



○ . . . pro 100 Individuen.
A. . . . Ausgekrochene Larve.
S. . . . Spinnreife.
vAIm. . . . vor dem Ausschlüpfen des Imagos.

Fig. 3.
Die Änderung des Wasserstoff-
gehaltes während des
Wachstums.



△ . . . pro 100g Frischgewicht.
A. etc. . . . I. Häutung etc.
V. . . . Verpuppungszeit.

3. Änderung des Aschengehaltes während des Wachstums.

Die Aschengehalt-Wachstumskurve (Aschen-K.) ist eine typische Kurve mit einem Höhepunkt, den sie im 5. Maximalfütterungsstadium hat. Dann fällt sie in der Spinnreife steil ab und wird in ihrem Absinken auch bei der Verpuppung nicht gehindert.

In dieser Beziehung ist die Aschen-K. ganz verschieden von der Tr-K., die ihren Gipfel bei spinnreifen Raupen hat.

Die Kurve, die den Aschengehalt pro 100 g Körpergewicht veranschaulicht, hat bei der eben ausgeschlüpften Larve ihren grössten Wert (2.20 g), allmählich nimmt sie gleichmässig ab, um

TABELLE IV.

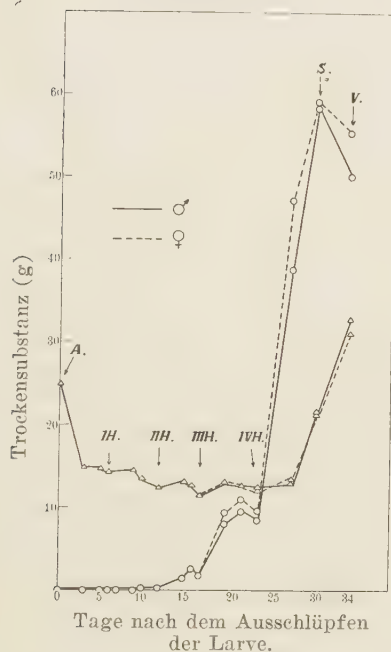
Die Änderung des Trockensubstanz- und Aschengehaltes während des Wachstums.

Tage nach dem Ausschlüpfen der Larve	Wachstums- stadium		Geschlecht	Material		Trocken- substanzgew. g	Aschengew. g	100 Tiere enthielten		Wassergehalt %	Aschen-Prozent bezogen auf Fri- schgew.
				Individuen	Frischgew. g			Trocken- substanz g	Asche g		
0	I. Wachs- tumsstufe	Ausschlüpfen Fütterungs- stad. während d. Schlafs		48948	20.000	5.0226	0.4400	0.0103	0.0009	74.89	2.20
3				5504	20.000	3.0014	0.3522	0.0545	0.0064	84.99	1.76
5				3216	20.004	3.0068	0.3265	0.0935	0.0102	84.97	1.63
6	II. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		4131	21.173	3.0832	0.3852	0.0746	0.0093	85.44	1.82
9				753	20.015	2.9602	0.3286	0.3931	0.0436	85.21	1.64
10				616	20.113	2.7174	0.3170	0.4411	0.0515	86.49	1.58
12	III. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		685	20.424	2.5040	0.3408	0.3656	0.0498	87.74	1.67
15				163	23.323	3.0676	0.3862	1.8820	0.2369	86.85	1.66
15				103	19.786	2.5010	0.3110	2.4281	0.3019	87.36	1.57
16	IV. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		150	23.785	2.7992	0.3885	1.8661	0.2590	88.23	1.63
19			♀	30	21.17	2.7650	0.3730	9.2167	1.2433	86.94	1.76
			♂	35	21.55	2.8030	0.3662	8.0086	1.0463	86.99	1.70
21			♀	30	27.03	3.4378	0.4086	11.4590	1.3620	87.28	1.51
			♂	30	22.89	2.9274	0.3550	9.7580	1.1833	87.21	1.55
23	V. Wachstums- stufe	nach d. Häut- ung	♀	30	24.78	2.9664	0.4132	9.8880	1.3440	88.03	1.67
			♂	30	22.62	2.7752	0.3626	9.2507	1.2087	87.73	1.60
27		Maximalfüt- terungsstad.	♀	8	26.96	3.6702	0.4961	47.1275	6.2013	86.39	1.84
			♂	8	23.28	3.0912	0.4442	38.6400	5.5525	86.72	1.91
30		Spinnreife	♀	8	22.93	4.7416	0.3104	59.2700	3.8800	79.32	1.35
			♂	8	21.61	4.6744	0.2828	58.3430	3.5350	78.37	1.31
34	Puppen- stadium	Verpuppungs- zeit	♀	10	17.99	5.5146	0.2646	55.1460	2.6460	69.35	1.47
			♂	10	15.33	4.9980	0.2465	49.9800	2.4650	67.40	1.61
46	Imago	Nach der Eiablage*	♀	200	84.33	18.3464	1.2306	9.1732	0.6153	78.25	1.46
		Nach der Kopulation*	♂	200	86.46	29.3330	1.3183	14.6665	0.6592	66.07	1.43
	Ei	2. Tag nach d. Eiablage		77383	44.7973	14.9062	0.8728	0.0193	0.0011	66.73	1.95

* Ohne Kokon.

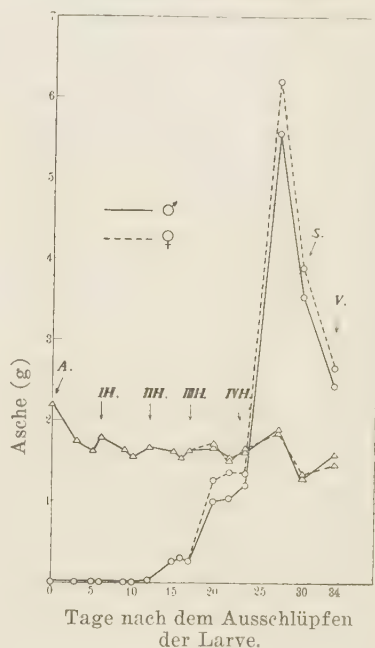
dann nach der Häutung wieder zu steigen. Alle Raupen haben nach der Häutung den höchsten Aschenprozentatz während des entsprechenden Stadiums.

Fig. 4.
Die Änderung des Trocken-
substanzgehaltes während
des Wachstums.



○ ... pro 100 Individuen.
A. ... Ausgekrochene Larve.
S. ... Spinnreife.

Fig. 5.
Die Änderung des Aschengehaltes
während des Wachstums.



△ ... pro 100 g Frischgewicht.
A. ... Ausgekrochene Larve.
S. ... Spinnreife.
V. ... Verpuppungszeit.
IH. etc. ... I. Häutung etc.

Bei der 5. Maximalfütterungsperiode waren die Raupen zwar reicher an Asche als bei der 4. Häutung, aber bei spinnreifen Raupen nahm der Aschengehalt wieder ab, um bei der Verpuppung wieder etwas zu steigen.

Während des ganzen Verlaufes dieser Kurve kann kein geschlechtlicher Unterschied beobachtet werden. Eine Ausnahme machen die Puppen. Die männliche Puppe übertrifft an Aschengehalt die weibliche.

4. Änderung des Natrium-Gehaltes während des Wachstums.

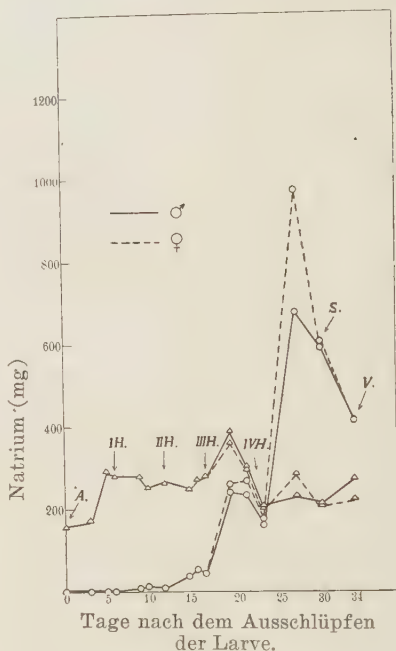
Die Na-Wachstumskurve (Na-K.) hat in der 5. Maximalfütterungsperiode ihren Gipfel und beginnt in der Spinnreife abzusinken, um dann bei der Verpuppung steil abzufallen. Da das Element Na im Aschengehalt des Seidenspinners nur in einem geringen Prozentsatz vertreten ist, unterscheidet sich die Na-K. ziemlich von der Asche-K.

Der Na-Gehalt in 1 Kg Frischgewicht zeigte bei ausgeschlüpfen Raupen den kleinsten Wert während des ganzen Wachstums (157.2 mg), um dann mit der Fütterung zu zunehmen. Nach jeder Häutung enthielten die Raupen im allgemeinen, aber nicht immer grössere Mengen Na, als während des entsprechenden Stadiums. Bei der 4. Häutung ist der Na-Wert sogar kleiner.

5. Änderung der K-Gehaltes während des Wachstums.

Kalium ist einer der überwiegenden Aschenbestandteile des Seidenspinners und infolgedessen war die K-Wachstumskurve (K.K.) der Aschenkurve sehr ähnlich. Die K.K. hatte also genau so wie die Aschen-K. ihren höchsten Wert beim 5. Maximalfütterungsstadium, um dann mit der Spinnreife und Verpuppung steil herunterzugehen. (Siehe Fig. 7).

Fig. 6.
Die Änderung des Natrium-
gehaltes während des
Wachstums.



- . . . pro 1000 Individuen.
- △ . . . pro 1 kg Frischgewicht.
- A . . . Ausgekrochene Larve.
- I.H. etc. . . . I. Häutung etc.
- S . . . Spinnreife.
- V . . . Verpuppungszeit.

Beiträge zum Wachstumsphänomen des Seidenspinners. 321

TABELLE V.

Die Änderung des Na-Gehaltes während des Wachstums.

Tage nach dem Ausschlüpfen der Larve	Wachstums- stadium		Geschlecht	Material		Trocken- substanzgew. g	Aschengew. g	Natrium g	Natrium mg. pro		
				Individuen	Frishgew. g				1000 Indi- viduen	1 kg. Frisch- gewicht	1 kg. Trock- engew
0 3 5	I. Wachs- tumsstufe	Ausgekrochen Fütterungs- stad. während d. Schlafs		48948	20.000	5.0226	0.4400	3.14	0.06	157.2	625.9
				5504	20.000	3.0014	0.3522	3.51	0.64	175.3	1167.9
				3216	20.004	3.0068	0.3265	5.84	1.82	292.1	1943.4
6 9 10	II. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		4131	21.173	3.0832	0.3852	5.92	1.43	279.4	1919.0
				753	21.015	2.9602	0.3286	5.62	7.47	281.0	1223.8
				616	20.113	2.7174	0.3170	5.11	8.30	254.2	1881.6
12 15 15	III. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		1829	55.104	6.7558	0.8880	14.41	7.88	261.5	2133.0
				163	23.323	3.0676	0.3862	5.77	35.40	247.4	1881.4
				103	19.786	2.5010	0.3110	5.41	52.48	273.2	2161.4
16 19 21	IV. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		150	23.785	2.7992	0.3885	6.54	43.63	275.1	2337.3
			♀	30	21.17	2.7650	0.3730	7.74	258.07	365.7	2800.2
			♂	35	21.55	2.8030	0.3662	8.40	240.00	389.8	2996.2
			♀	30	27.03	3.4378	0.4086	8.03	267.80	297.2	2336.5
			♂	30	22.89	2.9274	0.3550	7.01	233.70	306.3	2394.8
25 27	V. Wachstums- stufe	nach d. Häut- ung	♀	30	24.78	2.9664	0.4132	5.08	169.43	205.0	1712.6
			♂	30	22.62	2.7752	0.3626	4.73	157.77	209.2	1705.0
		Maximalfüt- terungsstad.	♀	8	26.96	3.6702	0.4961	7.74	967.75	287.2	2110.2
			♂	8	23.28	3.0912	0.4442	5.41	675.63	232.2	1748.5
30		Spinnreife	♀	8	22.93	4.7416	0.3104	4.82	602.50	210.2	1016.4
			♂	8	21.61	4.6744	0.2828	4.67	584.25	216.3	1000.0
34	Puppen- stadium	Verpuppungs- zeit	♀	100	179.84	55.1210	2.5498	40.90	409.00	227.4	741.7
			♂	100	150.60	49.0956	2.2882	40.90	409.00	272.7	836.5
46	Imago	Nach der Eiablage Nach der Kopulation	♀	200	84.33	18.3464	1.2306	20.01	100.06	237.3	1089.9
			♂	200	86.46	29.3330	1.3183	23.08	115.40	266.9	786.9

TABELLE VI.
Die Änderung des Kalium-Gehaltes während des Wachstums.

Tage nach dem Ausschlüpfen der Larve	Wachstums- stadium		Geschlecht	Material		Trocken- substanzgew. g	Aschengew. g	Kalium mg.	Kalium g. pro		
				Individuen	Frischgew. g				1000 Indi- viduen	1 kg. Frisch- gewicht	1 kg. Trock- engew.
0	I. Wachs- tumsstufe	Ausgekrochen Fütterungs- stad. während d. Schlafs		146844	60.000	15.0660	1.2876	273.15	1.86	4.5525	18.130
3				13760	50.000	7.5050	0.8614	235.90	17.14	4.7180	31.432
5				8041	50.016	7.5174	0.7796	192.01	23.88	3.8390	25.542
6	II. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		11707	60.003	8.7364	1.0352	267.51	22.85	4.4582	30.620
9				1886	50.101	7.4099	0.8120	216.71	114.91	4.3255	29.246
10				1675	54.763	7.3985	0.8426	217.84	130.05	3.9779	29.444
12	III. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		1829	55.104	6.7558	0.8880	239.29	130.83	4.3425	35.420
15				772	161.985	21.3010	2.6142	739.31	957.66	4.5641	34.708
15				802	150.427	19.0140	2.3078	603.87	752.95	4.0143	31.759
16	IV. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		718	110.249	12.9763	1.7662	443.02	617.02	4.0184	34.141
19			♀	100	72.76	9.5025	1.3004	354.42	3544.18	4.8711	37.298
			♂	100	63.77	8.2965	1.0782	304.75	3047.54	4.7790	36.733
21			♀	130	117.56	14.9536	1.7634	474.06	3646.63	4.0325	31.702
			♂	140	110.94	14.2892	1.6656	451.49	3224.91	4.0697	31.819
23	V. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Maximalfüt- terungsstad. Spinnreife	♀	130	105.79	12.6631	1.6134	468.42	3603.22	4.4278	36.991
			♂	125	93.60	11.4847	1.4924	409.16	3273.29	4.3714	35.627
27			♀	25	84.70	11.5277	1.4898	423.27	16930.80	4.9973	36.718
			♂	33	98.92	13.1366	1.7914	538.96	16332.24	5.4485	41.028
30			♀	30	85.97	17.7786	1.0532	279.92	9330.67	3.2561	15.745
			♂	30	81.40	17.6068	1.0130	269.76	8992.13	3.3141	15.322
34	Puppen- stadium	Verpuppungs- zeit	♀	100	179.84	55.1210	2.5498	541.79	5417.86	3.0126	9.829
			♂	100	150.60	49.0956	2.2882	479.71	7497.06	3.1853	9.771
46	Imago	Nach der Eiablage Nach der Kopulation	♀	200	84.33	18.3464	1.2306	242.68	1213.38	2.8777	13.231
			♂	200	86.46	29.3330	1.3183	268.07	1340.36	3.1005	9.141
	Ei	2. Tage nach d. Eiablage		77383	44.7973	14.9062	0.8728	148.99	2.42	3.3259	9.995

Betrachtet man den K-Gehalt pro 1 kg Frischgewicht, so schwankt der Wert (4.5525 g) bei frisch ausgekrochenen Raupen mit dem Verlauf des Wachstums. In jedem Stadium ist der K-Gehalt während der Fütterung am grössten. Die K-Kurve, die bei der 5. Maximalfütterungsperiode den Gipfel erreichte, fiel dann auf einmal bei der Spinnreife ab, wobei sie den kleinsten Wert der ganzen Lebenszeit zeigte, und ging in die der Verpuppung über.

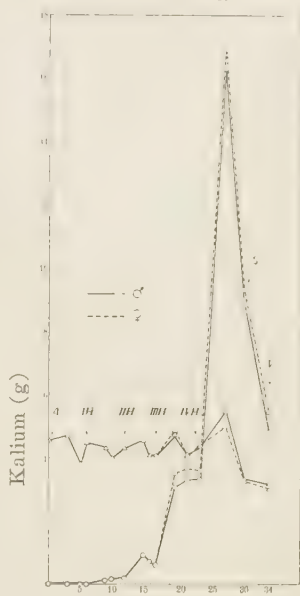
6. Änderung des Ca-Gehaltes während des Wachstums.

Ähnlich wie die Aschen-K. hatte die Ca-Wachstumskurve (Ca-K) ihren Gipfel bei der 5. Maximalfütterungsperiode, um dann während der Spinnreife und Verpuppung abzufallen. Der Ca-Gehalt pro 1 Kg Frischgewicht zeigte schon bei der ausgekrochenen Raupe seinen tiefsten Wert (335 mg Ca) während der ganzen Wachstumsperiode, nahm aber mit der Fütterung bedeutend zu. Während des 1. Schafes hatten die Raupen das 2.4fache der ausgekrochenen Raupen. Bei der 1. Häutung sank er dann wieder ab (559 mg Ca). In jedem Wachstumsstadium findet man das gleiche Verhältnis wieder. Die Larven zeigen nach der Häutung Minimal-, während des Schlafs Maximalwerte. (Siehe Fig. 8).

Bei den spinnreifen Raupen und Puppen ist ein geschlechtlicher Unterschied zu bemerken. Der absolute Ca-Gehalt übertraf zwar bei weiblichen spinnreifen Raupen deutlich der der männlichen, aber auf 1 kg Frischgewicht der Puppe bezogen, war der Ca-Gehalt bei männlichen Puppen grösser als bei weiblichen.

Fig. 7.

Die Änderung des Kaliumgehaltes während des Wachstums.



Tage nach dem Ausschlüpfen der Larve.

- . . . pro 1000 Individuen.
- △ . . . pro 1 kg Frischgewicht.
- A . . . Ausgekrochene Larve.
- IH. etc. . . . I. Häutung etc.
- S . . . Spinnreife.
- V . . . Verpuppungszeit.

TABELLE

Die Änderung des Calcium- und Magnesium-gehaltes

Tage nach dem Ausschlüpfen der Larve	Wachstumsstadium		Geschlecht	Material		Trocken- substanzgew. g
				Individuen g	Frischgew. g	
0	I. Wach- tumsstufe	Ausgekrochen		48948	20.000	5.0226
3		Fütterungsstad.		5504	20.000	3.0014
5		während d. Schlafs		3216	20.004	3.0068
6	II. Wach- tumsstufe	nach d. Häutung		4131	21.173	3.0832
9		Fütterungsstad.		753	20.015	2.9602
10		während d. Schlafs		616	20.113	2.7174
12	III. Wach- tumsstufe	nach d. Häutung		685	20.424	2.5040
15		Fütterungsstad.		163	23.323	3.0676
15		während d. Schlafs		103	19.786	2.5010
16	IV. Wachstums- stufe	nach d. Häutung		718	110.249	12.9763
19		Fütterungsstad.	♀	30	21.17	2.7650
			♂	35	21.55	2.8030
21		während d. Schlafs	♀	30	27.03	3.4378
			♂	140	100.94	14.1892
23	V. Wachstums- stufe	nach d. Häutung	♀	130	105.79	12.6631
			♂	125	93.60	11.4847
27		Maximalfütter- ungsstadium	♀	8	26.96	3.6702
			♂	8	23.28	3.0912
30		Spinntreife	♀	8	22.93	4.7416
			♂	30	81.40	17.6068
34	Puppen- stadium	Verpuppungszeit	♀	10	17.99	5.5146
			♂	10	15.33	4.9980
46	Imago	Nach der Eiablage	♀	200	84.33	18.3464
		Nach der Kopulation	♂	200	86.46	29.3330

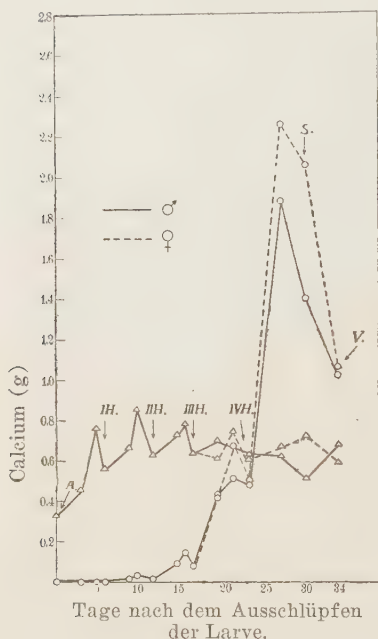
VII.

während des Wachstums.

Aschengew. %	Calcium mg	Magnesium mg	pro 1000 Individuen		pro 1 kg Frischgewicht		pro 1 kg Trockengewicht	
			Calcium mg	Magne- sium mg	Calcium mg	Magne- sium mg	Calcium g	Magne- sium g
0.4400	6.70	19.94	0.14	4.07	335.0	996.9	1.3341	3.9701
0.3522	9.05	8.74	1.65	1.59	452.6	437.0	3.0153	2.9114
0.3265	15.52	9.95	4.83	3.09	776.1	497.2	5.1637	3.3081
0.3852	11.83	11.60	2.86	2.81	558.6	548.0	3.8365	3.7637
0.3286	13.40	9.15	17.79	12.15	669.4	457.2	4.5260	3.0913
0.3170	17.42	9.83	28.28	15.96	866.0	388.9	6.4100	2.8786
0.3408	12.95	10.93	18.91	15.95	634.2	515.3	5.1729	4.2031
0.3862	16.97	12.29	104.12	75.41	727.7	527.0	5.5338	4.0076
0.3110	15.63	10.65	151.77	103.42	790.1	538.4	6.2508	4.2595
1.7662	71.46	60.74	99.53	84.60	468.2	551.0	5.5072	4.6814
0.3730	12.95	10.65	431.73	355.07	611.8	503.2	4.6845	3.8530
0.3662	15.35	11.33	438.60	323.71	712.3	525.8	5.4750	4.0415
0.4086	20.12	14.89	670.50	496.33	744.2	550.9	5.8506	4.3310
1.6656	72.89	62.49	520.64	446.36	657.0	563.3	5.1368	4.4042
1.6134	64.31	62.93	494.92	484.06	607.9	594.8	5.0785	4.9691
1.4924	60.03	54.19	480.21	433.44	641.3	578.9	5.2266	4.7180
0.4961	18.16	14.06	2269.38	1756.88	673.4	521.3	4.9478	3.8303
0.4442	14.96	13.25	1870.25	1655.88	642.7	569.0	4.8396	4.2846
0.3104	16.53	13.52	2065.63	1690.00	720.7	589.6	3.4850	2.8511
1.0130	41.45	43.70	1381.67	1456.67	509.2	536.9	3.3541	2.4822
0.2646	10.72	14.48	1071.90	1447.60	595.8	804.7	1.9439	2.6254
0.2465	10.27	12.97	1027.20	1297.30	670.1	846.3	2.0555	2.5960
1.2306	24.30	40.64	121.48	203.21	288.1	481.9	1.3244	2.2153
1.3183	25.01	57.03	125.06	285.01	289.3	659.6	0.8525	1.9445

Fig. 8.

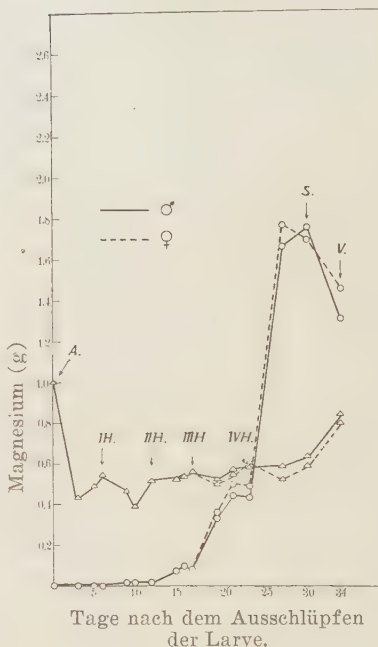
Die Änderung des Calcium-
gehaltes während des
Wachstums.



○ . . . pro 1000 Individuen.
A . . . Ausgekrochene Larve.
S . . . Spinnreife.

Fig. 9.

Die Änderung des Magnesium-
gehaltes während des
Wachstums.



△ . . . pro 1 kg Frischgewicht.
IH. etc. . . . I. Häutung etc.
V . . . Verpuppungszeit.

7. Änderung des Mg-Gehaltes während des Wachstums.

Die Mg-Wachstumskurve (Mg-K) war eine typische, die bei der 5. Maximalfütterungs-sowie Spinnreifenperiode ein Maximum zeigte, um dann allmählich gegen das Verpuppungsstadium abzusinken. Gegenüber der Gewichtskurve ist das ein bedeutender Unterschied. (Siehe oben)

Betrachtet man die Mg-Kurve auf 1 Kg Frischgewicht bezogen, so ist zu bemerken, dass die frisch ausgeschlüpften Raupen den grössten Mg-Wert während des ganzen Wachstums aufweisen (0.9969 g). In jeder Wachstumsstufe zeigt die enthäutete Raupe

im allgemeinen einen höheren Wert und nach der 4. Häutung nimmt in der Reihenfolge von 5. Maximalfütterungs-, Spinnreifen- und Verpuppungsstadium der Mg-Wert prozentuell allmählich zu, um bei Puppen einen hohen Wert, 0.8047 g (Weibchen), 0.8463 g (Männchen) zu erreichen.

8. *Änderung des Fe-Gehaltes während des Wachstums.*

Die Eisenwachstumskurve (Fe-K.) zeigte zwar keine bedeutenden Kennzeichen im Vergleich mit der Aschen-K. bis zur 3. Häutung, aber bei dem 4. Wachstumsstadium, wo die Raupe plötzlich stark an Körpergewicht zunahm, unterlag die Fe-K. einer merkwürdigen Fluktuation. Die Kurve, die bei dem 5. Maximalfütterungsstadium den grössten Wert, 424.0 mg Fe (Weibchen), 321.2 mg (Männchen) Fe pro 10,000 Individuen zeigte, nahm bei der Spinnreife auf einmal um $\frac{2}{3}$ ihres Wertes ab. Bei der Verpuppung sank sie noch etwas weiter ab.

Der Eisengehalt pro 1 Kg Frischgewicht betrug bei den Eiern (Tabelle VIII) und frisch ausgekrochenen Raupen 23.66 mg, resp. 15.83 mg Fe. Abgesehen von den 4. und 5. Perioden energischen Fressens war das der höchste Wert während des ganzen Wachstumsverlaufes. (Fig. 10)

9. *Änderung des Zinkgehaltes während des Wachstums.*

Der Zinkgehalt des Seidenspinners war selbstverständlich ein ganz winziger Anteil des Trocken- und auch des Aschengewichts. Obwohl die Zinkwachstumskurve (Zn-K) ganz ähnlich wie die Tr.K. verlief, war sie ganz verschieden von den anderen Kurven der formbildenden Elemente (Na, K, Ca), sowie auch des Fe und Mn. (Fig. 10, 12). Die Zn-K. zeigte ihren höchsten Punkt nicht bei dem 5. Maximalfütterungsstadium sondern bei dem Spinnreife-Stadium, und ging ohne abzusinken, in die Verpuppung über. Dieses Verhalten ist so interessant, dass darüber noch im nächsten Kapitel gesprochen wird.

Betrachtet man die Zinkkurve pro 1 Kg Frischgewicht, so ist zu bemerken, dass die frisch ausgekrochenen Raupen unver-

TABELLE VIII.
Die Änderung des Eisengehaltes während des Wachstums.

Tage nach dem Ausschlüpfen der Larve	Wachstums- stadium		Geschlecht	Material		Trocken- substanzgew. g	Aschengew. g	Eisen mg	Eisen mg. pro		
				Individuen	Frischgew. g				10,000 Indi- viduen	1 kg Fri- schgew.	1 kg Trockengew.
0	I. Wachs- tumsstufe	Ausgekrochen Fütterungs- stad. während d. Schlafs		146844	60.000	15.0660	1.2876	0.95	0.065	15.83	63.06
3				13760	50.000	7.5050	0.8614	0.41	0.298	8.20	54.63
5				8041	50.016	7.5174	0.7796	0.24	0.298	4.80	31.92
6	II. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		11707	60.003	8.7364	1.0352	0.44	0.375	7.33	50.36
9				1886	50.101	7.4099	0.8120	0.37	1.962	7.39	49.93
10				1675	54.763	7.3985	0.8426	0.19	1.134	3.47	25.68
12	III. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		1829	55.104	6.7558	0.8880	0.19	1.039	3.45	28.12
15				772	161.985	21.3010	2.6142	1.10	14.248	6.79	51.64
15				802	150.427	19.0140	2.3078	0.64	7.980	4.26	33.66
16	IV. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		718	110.249	12.9763	1.7662	0.48	6.685	4.35	36.99
19			♀	100	72.76	9.5025	1.3004	1.38	138.0	18.97	145.18
			♂	100	63.77	8.2965	1.0782	1.06	106.0	16.62	127.76
21			♀	130	117.56	14.9536	1.7634	0.44	33.8	3.74	29.43
			♂	140	110.94	14.1892	1.6656	0.44	31.4	3.97	31.01
23	V. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Maximalfüt- terungsstad. Spinnreife	♀	130	105.79	12.6631	1.6134	0.56	43.1	5.29	44.23
			♂	125	93.60	11.4847	1.4924	0.48	38.4	5.13	41.79
27			♀	25	84.70	11.5277	1.4898	1.06	424.0	12.52	91.95
			♂	33	98.92	13.1366	1.7914	1.06	321.2	10.72	80.69
30			♀	30	85.97	17.7786	1.0532	0.38	126.7	4.42	21.37
			♂	30	81.40	17.6068	1.0130	0.34	113.3	4.18	19.31
34	Puppen- stadium	Verpuppungs- zeit	♀	100	179.84	55.1210	2.5498	1.08	108.0	6.01	19.59
			♂	100	150.60	49.0956	2.2882	0.89	89.0	5.91	18.13
46	Imago	Nach der Eiablage Nach der Kopulation	♀	200	84.33	18.3464	1.2306	1.10	55.0	13.04	59.97
			♂	200	86.46	29.3330	1.3183	1.51	75.7	17.51	51.62
	Ei	2. Tage nach d. Eiablage		77383	44.7973	14.9062	0.8728	1.06	0.137	23.66	71.11

Beiträge zum Wachstumsphänomen des Seidenspinners. 329

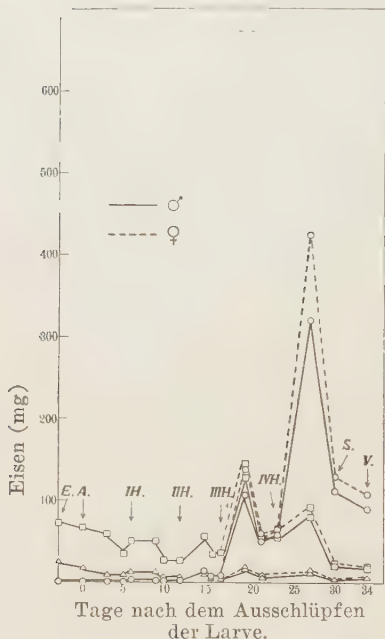
TABELLE IX.

Die Änderung des Zn-Gehaltes während des Wachstums.

Tage nach dem Ausschlüpfen der Larve	Wachstums- stadium		Geschlecht	Material		Trocken- substanzgew. g	Aschengew. g	Zink mg	Zink mg. pro		
				Individuen	Frischgew. g				10.000 In- dividuen	1 kg. Fri- schgew. mg	1 kg. Trockengew.
0 3 5	I. Wachs- tumsstufe	Ausgekrochen Fütterungs- stad. während d. Schlafs		146844	60.000	15.0660	1.2876	6.25	0.43	104.1	414.2
				13760	50.000	7.5050	0.8614	1.16	0.84	23.2	154.5
				8041	50.016	7.5174	0.7796	0.93	1.16	18.6	123.7
6 9 10	II. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		11707	60.003	8.7364	1.0352	1.39	1.19	23.2	159.1
				1886	50.101	7.4099	0.8120	0.53	2.78	10.5	70.9
				1675	54.763	7.3985	0.8426	0.66	3.94	12.1	89.2
12 15 15	III. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs		1829	55.104	6.7558	0.8880	0.66	3.61	12.0	97.7
				772	161.985	21.3010	2.6142	1.38	5.59	8.5	64.8
				802	150.427	19.0140	2.3078	0.98	12.22	6.5	51.5
16 19 21	IV. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Fütterungs- stad. während d. Schlafs	♀	718	110.249	12.9763	1.7662	0.88	12.26	8.0	67.8
			♂	100	72.76	9.5025	1.3004	0.90	90.00	12.4	94.7
			♀	100	63.77	8.2965	1.0782	0.65	65.00	10.2	78.3
			♂	130	117.56	14.9536	1.7634	1.29	99.23	11.0	86.2
			♂	140	110.94	14.1892	1.6656	1.37	97.86	12.4	96.6
23 27 30	V. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung Maximalfüt- terungsstad. Spinnreife	♀	130	105.79	12.6631	1.6134	1.22	93.85	11.5	96.3
			♂	125	93.60	11.4847	1.4924	1.04	83.20	11.1	90.5
			♀	25	84.70	11.5277	1.4898	0.80	320.0	9.5	69.4
			♂	33	98.92	13.1366	1.7914	0.88	266.7	8.9	66.9
			♀	30	85.97	17.7786	1.0532	1.90	633.3	22.1	106.9
			♂	30	81.40	17.6068	1.0130	1.44	480.0	17.7	81.8
34	Puppen- stadium	Verpuppungs- zeit	♀	100	179.84	55.1210	2.5498	6.40	640.0	35.6	116.1
			♂	100	150.60	49.0956	2.2882	4.64	464.0	30.8	94.5
46	Imago	Nach der Eiablage Nach der Kopulation	♀	200	84.33	18.3464	1.2306	3.84	192.0	45.5	209.0
			♂	200	86.46	29.3330	1.3183	4.44	222.0	51.4	151.4
	Ei	2. Tage nach d. Eiablage		77383	44.7973	14.9062	0.8728	3.96	0.51	88.4	265.7

Fig. 10.

Die Änderung des Eisengehaltes
während des Wachstums.



○ ... pro 10000 Individuen.

□ ... pro 1 kg Trockengewicht.

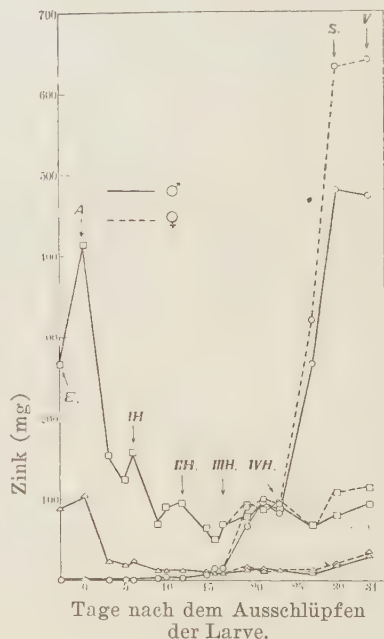
E ... Ei.

IH. etc. ... I. Häutung etc.

V ... Verpuppungszeit.

Fig. 11.

Die Änderung des Zinkgehaltes
während des Wachstums.



△ ... pro 1 kg Frischgewicht.

A ... Ausgekrochene Larve.

S ... Spinnreife.

gleichlich grosse Mengen Zink (104.1 mg) enthielten. Auch die Raupen hatten nach der Häutung prozentuell viel mehr als sie während des Fressens in dem entsprechenden Wachstumsstadium enthielten.

Dieses Verhältnis wird deutlicher beim Betrachten der Zn-Kurve pro 1 Kg Trockengewicht. (Fig. 11)

10. Änderung des Mn-Gewichtes während des Wachstums.

Die Mn- und Fe-Wachstumskurven zeigen grosse Ähnlichkeit. Die Mn-Kurve zeigte eine grosse Steigerung nach der 3. Häutung

in Folge des energischen Fressens, und die Kurve, die bei der 4. Häutung abgesunken war, erreichte bei dem 5. Maximalfütterungsstadium den Gipfel in der ganzen Lebensperiode, um dann mit der Zeit der Spinnreife und Verpuppung abzusinken. (Fig. 12)

Verfolgt man die Mn-Kurve pro 1 Kg Frischgewicht während des Wachstums, so zeigen die frisch ausgekrochenen Larven im Gegensatz zu den anderen katalytischen Elementen den kleinsten Wert (1.72 mg) in der ganzen Lebensgeschichte. Bei dem 1. Fütterungsstadium stieg aber die Kurve steil an, um dann nach der Häutung wieder abzusinken. Solche ausgeprägten Steigerungen als Folge des energischen Fressens wiederholten sich in jedem Stadium regelmässig. Dieses Verhältnis wird deutlicher beim Betrachten der Kurve pro Kg-Trockengewicht.

11. *Änderung des Cu-Gehaltes während des Wachstums.*

In grossen Zügen war die Cu-Wachstumskurve ähnlich wie die Fe- und Mn-Kurve. Diese Cu-Kurve erreichte nach einer kleinen Erhebung beim 4. Schlaf ihren Gipfel beim 5. Maximalfütterungsstadium, um dann allmählich mit der Zeit der Spinnreife und der Verpuppung abzusinken. (Fig. 13)

Beim Betrachten des Cu-Gehaltes pro 1 kg Frischgewicht ist zu bemerken, dass der Cu-Gehalt ähnlich wie die anderen katalytischen Elemente (Fe, Zn) bei den frisch ausgeschlüpfen Raupen den höchsten Wert (3.57 mg) im ganzen Lebensverlauf hatte. Ausserdem enthielten die enthäuteten Raupen (ähnlich wie bei Fe und Mn) weniger Cu als die Raupen während des Schlafs.

ALLGEMEINE BETRACHTUNGEN.

1. *Über den Trockensubstanz-, Wasser-, Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Aschengehalt.*

a) *Veränderung bei der Häutung.*

Durch die Ergebnisse meiner Arbeiten wurde klargestellt, dass der Wassergehalt in jedem Wachstumsstadium nach der Häutung am grössten und während des Fressens am kleinsten war.

Viele Autoren, u.a. die Herren Prof. S. Kawase (1913) und

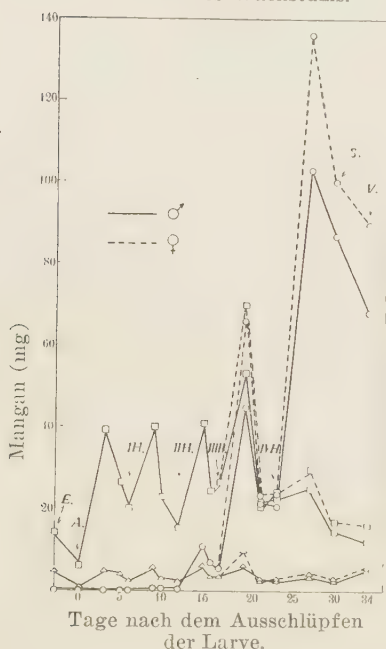
TABELLE X.

Die Änderung des Mangangehaltes während des Wachstums.

Tage nach dem Auschlüpfen der Larve	Wachstums- stadium		Geschlecht	Material		Trocken- substanzgew. g	Aschengew. g	Mangan mg	Mangan mg pro		
				Individuen	Frischgew. g				10,000 In- dividen	1 kg Fris- chgew.	1 kg Trockengew.
0	I. Wachs- tumsstufe	Ausgekrochen		146844	60.000	15.0660	1.2876	0.103	0.007	1.72	6.86
3		Fütterungs- stad.		13760	50.000	7.5050	0.8614	0.296	0.215	5.92	39.44
5		während d. Schlafs		8041	50.016	7.5174	0.7796	0.201	0.250	4.02	26.74
6	II. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung		11707	60.003	8.7364	1.0352	0.175	0.149	2.92	20.03
9		Fütterungs- stad.		1886	50.101	7.4099	0.8120	0.296	1.569	5.91	39.95
10		während d. Schlafs		1675	54.763	7.3985	0.8426	0.175	1.045	3.20	23.66
12	III. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung		1829	55.104	6.7558	0.8880				
15		Fütterungs- stad.		772	161.985	21.3010	2.6142	0.888	11.503	5.48	41.69
15		während d. Schlafs		802	150.427	19.0140	2.3078	0.464	5.786	3.09	24.41
16	IV. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung		718	110.249	12.9763	1.7662	0.340	4.735	3.08	26.20
19		Fütterungs- stad.	♀	100	72.76	9.5025	1.3004	0.664	66.400	9.13	69.88
			♂	100	63.77	8.2965	1.0782	0.443	44.300	6.95	53.39
21		während d. Schlafs	♀	130	117.56	14.9536	1.7634	0.301	23.154	2.56	20.13
			♂	140	110.94	14.1892	1.6656	0.301	21.500	2.71	21.21
23	V. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung	♀	130	105.79	12.6631	1.6134	0.301	23.154	2.85	23.77
			♂	125	93.60	11.4847	1.4924	0.262	20.960	2.80	22.81
27		Maximalfüt- terungsstad.	♀	25	84.70	11.5277	1.4898	0.340	136.00	4.01	29.49
			♂	33	98.92	13.1366	1.7914	0.340	103.03	3.44	25.88
30		Spinnreife	♀	30	85.97	17.7786	1.0532	0.301	100.33	3.50	16.93
			♂	30	81.40	17.6068	1.0130	0.262	87.33	3.22	14.88
34	Puppen- stadium	Verpuppungs- zeit	♀	100	179.84	55.1210	2.5498	0.888	88.80	4.94	16.11
			♂	100	150.60	49.0956	2.2882	0.680	68.00	4.52	13.85
	Ei	2. Tage nach d. Eiablage		77383	44.7973	14.9062	0.8728	0.222	0.029	4.96	14.89

Fig. 12.

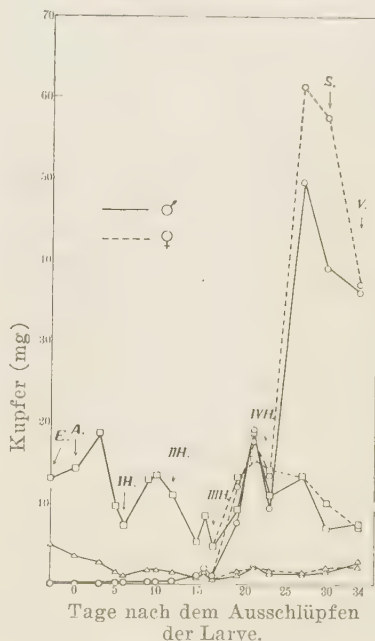
Die Änderung des Mangangehaltes während des Wachstums.



○ . . . pro 10000 Individuen. △ . . . pro 1 kg Frischgewicht.
 □ . . . pro 1 kg Trockengewicht.
 E . . . Ei. A . . . Ausgekrochene Larve.
 IH. etc. . . . I. Häutung etc. S . . . Spinnreife.
 V . . . Verpuppungszeit.

Fig. 13.

Die Änderung des Kupfergehaltes während des Wachstums.



Prof. E. Hiratsuka (1917, 1920) haben auch schon diese Beobachtungen gemacht. Vor einigen Jahren veröffentlichte Herr Dr. K. Kuroda (1934) eine Arbeit, in der er mit Hilfe seiner Mikromethode zur Bestimmung des Wassergehaltes von biologischen Körperflüssigkeiten sehr interessante Resultate über den Wassergehalt der Seidenspinnerhämolymph während des Wachstums gefunden hatte. Er teilte dabei mit, dass die Raupen nach jeder Häutung—es war ihm geglückt, schon vom 1. Wachstumsstadium an den Wassergehalt der Hämolymph quantitativ zu bestimmen—den grössten Wassergehalt der Hämolymph während des betref-

TABELLE XI.
Die Änderung des Kupfergehaltes während des Wachstums.

Tage nach dem Auschlüpfen der Larve	Wachstums- stadium		Geschlecht	Material		Trocken- substanzgew. g	Aschengew. g	Kupfer mg	Kupfer mg pro		
				Individuen	Frischgew. g				10,000 In- dividuen	1 kg Fris- chgew.	1 kg Trockengew.
0	I. Wachs- tumsstufe	Ausgekrochen		146844	60.000	15.0660	1.2876	0.215	0.015	3.57	14.21
3		Fütterungs- stad.		13760	50.000	7.5050	0.8614	0.140	0.102	2.79	18.60
5		während d. Schlafs		8041	50.016	7.5174	0.7796	0.074	0.092	1.48	9.84
6	II. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung		11707	60.003	8.7364	1.0352	0.062	0.053	1.03	7.07
9		Fütterungs- stad.		1886	50.101	7.4099	0.8120	0.096	0.511	1.92	13.01
10		während d. Schlafs		693	21.170	2.8601	0.3258	0.039	0.566	1.85	13.71
12	III. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung		825	25.088	3.0758	0.4042	0.035	0.424	1.40	11.38
15		Fütterungs- stad.		450	64.775	8.5179	1.0455	0.045	1.000	0.70	5.29
15		während d. Schlafs		802	150.427	19.0140	2.3078	0.157	1.956	1.04	8.25
16	IV. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung		718	110.249	12.9763	1.7662	0.058	0.808	0.53	4.47
19		Fütterungs- stad.	♀ ♂	70 65	49.53 41.39	6.4686 5.3848	0.8826 0.6999	0.084 0.050	12.03 7.72	1.69 1.21	12.94 9.32
21		während d. Schlafs	♀ ♂	58 60	52.23 46.96	6.6437 6.0062	0.7835 0.7049	0.103 0.115	17.83 19.10	1.98 2.44	5.57 19.08
23		nach d. Häut- ung	♀ ♂	60 65	48.91 46.16	5.8545 5.6638	0.7459 0.7358	0.082 0.060	13.63 9.23	1.67 1.30	13.97 10.60
27	V. Wachs- tumsstufe	Maximalfüt- terungsstad.	♀ ♂	12 12	42.09 35.38	5.7284 4.6985	0.7404 0.6407	0.074 0.059	61.5 49.3	1.75 1.67	12.88 12.60
30		Spinnreife	♀ ♂	15 15	41.95 41.15	8.6753 8.9008	0.5139 0.5119	0.087 0.058	57.7 38.6	2.06 1.41	9.98 6.51
34	Puppen- stadium	Verpuppungs- zeit	♀ ♂	100 100	179.84 150.60	55.1210 49.0956	2.5498 2.2882	0.368 0.359	36.8 35.90	2.05 2.39	6.68 7.32
	Ei	2. Tage nach d. Eiablage		77383	44.7973	14.9062	0.8728	0.195	0.025	4.35	13.08

fenden Stadiums zeigten und zitierte meine Resultate (Akao 1932 d). Bezüglich des Körperwassergehaltes des Seidenspinners kam er zu der gleichen Überlegung wie ich.

Betrachtet man Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Aschengehalt pro 100 g Körpergewicht, so hatten die Raupen nach jeder Häutung den kleinsten Kohlen- und Wasserstoffgehalt in der entsprechenden Wachstumsperiode.

Die Tatsache, dass die Raupe nach der Häutung nicht nur den grössten Wassergehalt des Körpers sowie der Hämolymphe sondern auch stofflich den kleinsten Kohlen- und Wasserstoffgehalt und den grössten Aschengehalt während des entsprechenden Wachstumsstadiums zeigt, hat uns nicht nur bei der Forschung über die Diapause und Häutung des Seidenspinners allein sondern überhaupt allegemein der Insekten viel zu sagen. In dieser Hinsicht sind die Ergebnisse der Arbeiten von Demjanowski & Prokoffjeva (1935) und Herrn Dr. Kuwana (1937) sehr interessant. Nach ihnen zeigt die gesamte Reduktionskraft der Seidenspinnerhämolymphe gleich vor jeder Häutung den höchsten Wert. Es lässt sich vermuten, dass die Zustandsänderung des Körperwassers sowie eine Reihe der chemischen Erscheinungen während des Schlafs als die Vorbereitung des beginnenden Wachstums lebhaft vor sich gehen.

b) *Frischausgekrochene Raupe.*

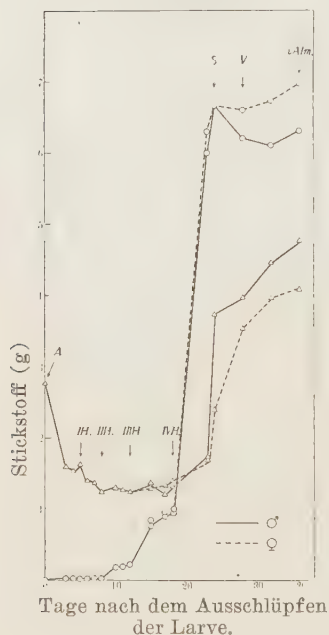
Es ist von grossem Interesse, dass die frisch ausgekrochenen Raupen den höchsten Trocken-, Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Aschen- und Stickstoffgehalt (Akao 1932 b) während des Jugend-Wachstumsstadium zeigten. (Tab. III, IV, u. Fig. 14).

c) *Veränderungen vor und nach der Verpuppung.*

Im späteren Stadium als dem 5. maximalen Fressen, zeigte der Aschengehalt ein gegensätzliches Verhalten zu dem Trocken-, Kohlenstoff-, Wasserstoff-, und Stickstoffgehalt bei beiden Geschlechtern. Erst im späteren Puppenstadium, wo die Entwicklung der Geschlechtsorgane vollendet ist, kam der geschlechtliche Unterschied bezüglich des Körperwasser-, Kohlenstoff- und Wasserstoffgehaltes deutlich zum Vorschein. Nach der geschlechtlichen Funktion nahm der Körperwassergehalt des männlichen Schmetterlings

Fig. 14.

Die Änderung des Stickstoffgehaltes während des Wachstums.



○ . . . pro 100 Individuen.
 △ . . . pro 100 g Frischgewicht.
 A . . . Ausgekrochene Larve.
 IH, etc. . . . I. Häutung etc.
 S . . . Spinnreife.
 vAIm . . . vor dem Ausschlüpfen
 des Images.

enorm ab, im Gegensatz blieb aber der des Weibchens vor und nach der Eiablage praktisch unverändert. Gleiche Ergebnisse hat auch Herr Prof. E. Hiratsuka veröffentlicht (1917, 1920).

Solche Ergebnisse sind von grossem Interesse, wenn man bedenkt, dass während des späteren Puppenstadiums einerseits das Körperfett zwar bei Weibchen weiter abnahm, aber bei Männchen fast unvermindert blieb. (Siehe Hiratsuka, 1917, 1920, Akao, 1931 b, Ozaki, 1936) und andererseits das Männchen im Wassergehalt der Hämolymphe das Weibchen überholte (Kuroda, 1934).

2. Die Besonderheiten der Na-, K-, Ca-, und Mg-Wachstumskurve.

a) *K-Gehalt*: Weil die Maulbeerblätter an Kalium sehr reich sind, behielten die Raupen während des Fressens grosse Mengen Kalium als Futterrest und Kot im Darm zurück. Demgegenüber enthielten die Raupen nach der Häutung, die spinnreifen Raupen und die Puppen viel kleinere

Mengen Kalium und ins besondere seinen Wert an Puppen könnte man praktisch als wahren K-Gehalt des Individuums annehmen. (Siehe Tab. XII).

b) *Ca-Gehalt*: Während des Schlafs hatten die Raupen den grössten Calcium-Gehalt, der sich dann bei der Häutung stark verringerte. Diese typische Veränderung im Anschluss an die Häutung tritt noch viel deutlicher beim Betrachten der Ca-Prozentkurve aus dem Aschengehalt hervor (Tab. XIII). Die

TABELLE XII.

Na-, K-, Ca- und Mg-Gehalt der abgelegten Haut bei der Verpuppung.
(Japan. Rasse 107, 17/VI '33)

Individuen	Frischgewicht g.	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.	
403	4.03		0.2792	

	Na	K	Ca	Mg
Aus 0.2792 g. Asche	12.66 mg.	90.30 mg.	22.30 mg.	7.34 mg.
pro 10,000 Individuen	0.3141 g.	2.2408 g.	0.5534 g.	0.1821 g.
In % der Asche	4.53	32.35	7.99	2.63

Analysenergebnisse der abgelegten Haut bei der Verpuppung klären auch diese Verhältnisse.

Der absolute Ca-Gehalt des Männchens, der bei den spinnreifen Raupen bedeutend kleiner als der des Weibchens war, wurde bei der Puppenperiode vom Weibchen fast übertroffen.

Diese Tatsache könnte man dadurch erklären, dass der überwiegende Anteil des gesamten Puppencalciums in den Kokon übergang (Siehe Tab. XIV). Dabei ist der Kokon bei beiden Geschlechtern beinahe gleich schwer, obwohl das Puppengewicht des Weibchens demjenigen des Männchens weitaus überlegen ist.

Hierzu sind die beiden folgenden Angaben von Interesse.

1) Die Raupen von *Antheraea pernyi* Gner, eine Rasse der wilden Seidenraupen, haben nach der Angabe von T. Nagaoka (1909) die eigentümliche Gewohnheit, die eigene abgestreifte Haut wieder zu verschlucken, um sie dann nach einigen Stunden wiederum auszuspuken. Sofortiges Wegnehmen der abgelegten Haut vor dem Fressen kann ein gestörtes Wachstum verursachen.

2) Bei der Flacherie des Seidenspinners nimmt der Ca-Gehalt der Hämolymphe nach den Ergebnissen von O. Fujii (1926) deutlich ab.

Diese Beobachtungen und die Ergebnisse meiner Arbeiten begründen die Vermutung, dass der Calcium-Bestand bei der Häutung und Spinnung, überhaupt im 5. Wachstumsstadium, wo die Entwicklung der Seidendrüsen lebhaft fortschreitet, in dem

TABELLE XIII.

Die Änderung des Gehaltes der verschiedenen Aschenbestandteile in % der Asche während des Wachstums.
(Japanische Rasse 107, 18/X — 1932).

Tage nach dem Ausschlüpfen d. r. Larve	Wachstums- stadium		Geschlecht	Na	K	Ca	Mg	Zn	Fe	Mn	Cu
				%	%	%	%	%	%	%	%
0	I. Wachs- tumsstufe	Ausgekrochen		0.71	20.69	1.52	4.53	0.473	0.072	0.008	0.016
3		Fütterungs- stad.		1.00	26.79	2.57	2.48	0.132	0.047	0.034	0.016
5		während d. Schlafs		1.79	23.52	4.76	3.05	0.114	0.029	0.025	0.009
6	II. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung		1.54	24.51	3.07	3.01	0.128	0.043	0.016	0.006
9		Fütterungs- stad.		1.71	26.34	4.08	2.78	0.043	0.045	0.036	0.017
10		während d. Schlafs		1.61	25.22	5.49	2.47	0.077	0.022	0.020	0.012
12	III. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung		1.57	26.02	3.80	3.09	0.072	0.021	0.013	0.008
15		Fütterungs- stad.		1.49	27.56	4.39	3.18	0.051	0.041	0.033	0.004
15		während d. Schlafs		1.74	25.54	5.03	3.42	0.041	0.028	0.020	0.007
16	IV. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung	♀	1.68	24.59	3.97	3.37	0.049	0.027	0.019	0.003
19		Fütterungs- stad.	♂	2.08	27.65	3.47	2.86	0.070	0.108	0.052	0.010
21		während d. Schlafs	♀	2.29	28.13	4.19	3.09	0.060	0.098	0.041	0.007
			♂	1.97	26.67	4.92	3.64	0.073	0.025	0.017	0.013
			♂	1.98	26.24	4.24	3.63	0.080	0.026	0.018	0.016
23	V. Wachs- tumsstufe	nach d. Häut- ung	♀	1.23	26.55	3.64	3.57	0.069	0.032	0.017	0.010
27		Maximalfüt- terungsstad. Spinntreife	♂	1.30	27.25	4.00	3.61	0.069	0.032	0.017	0.008
			♀	1.56	27.16	3.66	2.83	0.052	0.068	0.022	0.010
♂			1.22	28.56	3.37	2.98	0.047	0.056	0.018	0.009	
♀			1.55	24.05	5.32	4.35	0.163	0.033	0.026	0.015	
♂			1.65	25.32	3.89	4.10	0.135	0.032	0.025	0.011	
34		Puppen- stadium	Verpuppungs- zeit	♀	1.55	20.48	4.05	5.47	0.242	0.041	0.034
♂	1.70		19.81	4.17	5.26	0.192	0.037	0.028	0.015		
46	Imago	Nach der Eiablage	♀	1.59	19.71	1.98	3.30	0.312	0.089		
		Nach der Kopulation	♂	1.75	20.34	1.90	4.33	0.337	0.115		
	Ei	2. Tage nach d. Eiablage			16.68			0.454	0.121	0.025	0.022

normalen physiologischen Verlauf des Seidenspinners eine grosse Rolle spielt.

c) Im Gegensatz zu den anderen formbildenden Elementen (Na, K, Ca) enthielten die frisch ausgeschlüpften Raupen den grössten Mg-Wert. Das Magnesium scheint also in diesem Sinne vielmehr nähere Beziehungen zu den katalytischen Elementen zu haben. (Siehe Tabelle XIII).

TABELLE XIV.

Verteilung des Calciums in der Puppe und dem Kokon.
(Japan. 107, 17/VI '33)

100 Puppen		Ca-Gehalt pro		
Kokons	Puppen (exkl. Kokons)	100 Individuen (inkl. Kokons)	100 Kokons	100 abgelegte Häute
♀ 24.44 g.	155.40 g.	107.19 mg.	71.14 mg.	5.53 mg.
♂ 24.96 g.	125.96 g.	102.72 mg.		

3. Das Verhalten der katalytischen Elemente während des Wachstums.

a) Die Tatsache, dass die frisch ausgekrochenen Raupen nicht nur Fe¹⁾ sondern auch Zn und Cu in unvergleichbar grossen Mengen enthielten, ist sehr wichtig. Das bekannte Bunge- und Bertrandsche Phänomen (Bunge 1889, 1892; Bertrand und Vladesco 1921), das die beiden Autoren seinerzeit unter der oligodynamischen Wirkung der katalytischen Elemente nur auf das Säugetier-Wachstum bezogen, muss also eine Erweiterung auf die Insekten erfahren. Im Gegensatz zu den Säugetieren verhält sich aber das Mangan bei den Seidenspinnern, d. h. die frisch ausgekrochenen Raupen enthielten den geringsten Mn-Gehalt. Dieser nahm dann mit der Fütterung stark zu. Dieses Verhalten wird später noch ausführlicher behandelt. Hier soll nur betont werden, dass Mn bei dem Seidenspinner eine von den anderen katalytischen

1) Nur im Bereich des Fe-Gehaltes wurde schon von Kojima (1930) u. a. mitgeteilt.

Elementen ganz verschiedene physiologische Bedeutung haben muss. (Siehe Tabelle XIII).

b) Weil die Maulbeerblätter ausser K, Ca in grossen Mengen auch mehrere katalytische Elemente, abnehmend mit der Reihenfolge von Mn, Fe, Zn enthalten, (Tab. XV) können die im Verdauungskanal zurückgebliebenen Maulbeerblätter sowie Kotstückchen mehr oder weniger die Resultate des wahren Gehalts der Körperbestandteile des Seidenspinners beeinflussen. In dieser Beziehung wurde der Fe- und Mn-Gehalt des Körpers sehr, dagegen der Zn-Gehalt wenig beeinflusst; zwischen diesen beiden lag der Cu-Gehalt. In grossen Zügen war der Cu-Gehalt während der Fütterung oder während des Schlafs höher als nach der Häutung.

TABELLE XV.

Zn-, Fe- und Mn-Gehalt in den Maulbeerblättern.
(„Ichihei“, 19/VI '33)

Frischgewicht g.	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.			
391.35	82.1563	10.4752			
	Zn.	Fe	Mn		
Aus 10.4752 g Asche	1.75 mg.	5.13 mg.	9.80 mg.		
pro 1 kg Frischgewicht	4.47 mg.	13.14 mg.	25.04 mg.		
pro 1 kg Trockengewicht	21.3 mg.	62.4 mg.	119.3 mg.		
In % der Asche	0.0167	0.0490	0.0935 *		

* Nach der Angabe von Herrn Dr. Šk. Bito (1927) war der Mn-Gehalt in den Maulbeerblättern in verschiedenen Jahreszeiten 0.04–0.5% der Asche (als Mn_2O_4 berechnet).

Wie schon aus den Ergebnissen meiner Untersuchungen hervorgeht, unterlag der Gehalt der verschiedenen Körperbestandteile, insbesondere der Gehalt der katalytischen Elemente einerseits einer eigentümlichen Fluktuation, welche durch das im Verdauungskanal zurückbleibenden Futter verursacht und infolgedessen in jeder Wachstumsstufe wiederholt beobachtet wurde, und andererseits einer bestimmten und eindeutigen Änderung, welche durch den Wachs-

tumszustand sowie das Geschlecht u.s.w. verursacht wurde. Die letzt genannte Änderung des Gehaltes, welche in jeder Wachstumsperiode hervorgebracht wurde, soll sich auch wiederum in die Änderung der aktiven Körperbausteine und die Änderung der nicht so aktiven Bestandteile wie Sekretstoffe oder ihre Vorstufen teilen. Der Gehalt der einzelnen Stoffe hängt also dabei von den Umständen ab, ob entweder die aktiven Körperbestandteile oder die von ihnen produzierten Bestandteile überhandnehmen.

Es müssen also, wenn man zu einwandfreien Schlüssen über den realen Gehalt des einzelnen Körperbestandteils kommen will, alle die angeführten Umstände berücksichtigt und analysiert werden.

c) Physiologische Bedeutung des Zinks und Mangans im Seidenspinnerwachstum.

Abweichend vom Verhalten der anderen katalytischen Elemente war der Zn-Gehalt bei den spinnreifen Raupen grösser als der bei dem 5. Maximalfütterungsstadium. Er blieb auch dann bis zur Verpuppung auf der gleichen Höhe. Ausserdem war die weibliche Puppe reicher an Zink als die männliche.

Wie sollen solche Eigentümlichkeiten erklärt werden?

Wie verteilen sich Zn und Mn in den verschiedenen Organen und Geweben des Seidenspinners?

Um diese Fragen zu klären, wurde eine Reihe von Untersuchungen vorgenommen. Diese ergaben, dass grosse Mengen Zn in der Ovarien und Eiern erhalten waren (Tab. XVI, u. XVII). Speziell im Embryo fand sich Zink—in meinem Fall in der frisch ausgekrochenen Raupe (Es waren etwa 80% des gesamten Zn-Gehaltes aus dem Ei.)—; Mn dagegen lokalisierte sich bis auf 90% in der Eischale. (Siehe Tab. XVIII)

Ganz anders lagen die Dinge bei der abgelegten Haut und bei dem Kokon. Hier war nämlich Mn stärker vertreten. (Siehe Tab. XIX, u. XX). Ganz abweichend von ihrem Sekret, dem Kokon, verhielten sich die Seidendrüsen. Sie enthielten nämlich über das Zehnfache mehr an Zn als der Kokon. (Es handelt sich hier natürlich um Kokons, die vom gleichen Seidenspinner gesponnen worden sind).

TABELLE XVI.

K-, Zn-, und Mn-Gehalt der Ovalien.
(Japan. Russe 107, am 9. Puppentag, 20/VI '34)

Individuen	Frischgewicht g.	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.
150	58.472	16.7446	0.9566
	K	Zn	Mn
Aus 0.9566 g Asche	216.15 mg.	2.14 mg.	0.256 mg.
pro 10,000 Individuen	14.41 g.	143.6 mg.	17.93 mg.
pro 1 kg Trockensubstanz	12.9086 g.	127.8 mg.	15.26 mg.
In % der Asche	22.60	0.224	0.027

TABELLE XVII.

K-, Zn-, Fe-, Mn- und Cu-Gehalt der Seidenspinnereier.
(Japanische Rasse 107, bivoltine Eier am 2. Tag nach der Eiablage)

Individuen	Frischgewicht g.	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.		
77383	44.7973	14.9062	0.8728		
	K	Zn	Fe	Mn	Cu
Aus 0.8728 g. Asche	148.99 mg.	3.96 mg.	1.06 mg.	0.222 mg.	0.195 mg.
pro 10,000 Individuen	24.24 mg.	0.512 mg.	0.137 mg.	0.029 mg.	0.025 mg.
pro 1 kg Trockensubst.	9.995 g.	265.66 mg.	71.11 mg.	14.89 mg.	13.08 mg.
In % der Asche	16.68	0.454	0.121	0.025	0.022

TABELLE XVIII.

Verteilung des Zinks und Mangans im Seidenspinnerei.
(Chinesische Russe 14 × Europäische Rasse 17, 28/VII '34)

i) Frisch ausgeschlüpfte Larve.

Individuen	Frischgewicht g.	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.
66850*	30.8250 mg.	6.6414	0.5726

* Berechnet aus dem Wert (9667 Individuen = 4.4578 g)

	Zn	Mn
Aus 0.5726 g Asche	3.28 mg.	0.02 mg.
pro 10,000 Individuen	0.491 mg.	0.003 mg.
In % der Asche	0.573	0.003

ii) Eischale.

Zahl	Frishgewicht g.	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.
216450**	17.2680	13.1356	0.3088

** Berechnet aus dem Wert, (7999 Eischalen = 0.6382 g).

	Zn	Mn
Aus 0.3080 g Asche	1.98 mg.	0.68 mg.
pro 10,000 Eischalen	0.092 mg.	0.031 mg.
In % der Asche	0.641	0.220

TABELLE XIX.

Zink-, Eisen- und Mangangehalt der bei der Verpuppung abgelegten Haut.
(Japanische Rasse 107 ♀, 17/VI '33)

Individuen	Frishgewicht g.	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.
489	4.8994	4.4132	0.4016

	Zn	Fe	Mn
Aus 0.4016 g Asche	0.365 mg.	0.53 mg.	0.392 mg.
pro 10,000 Individuen	7.464 mg.	10.842 mg.	8.017 mg.
In % der Asche	0.091	0.132	0.098

TABELLE XX.

Zink-, Eisen- und Mangangehalt des Kokons.
(Japanische Rasse 107 ♀, 17/VI '33)

Zahl	Frishgewicht g.	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.
439	114.5368	103.92	1.3286

	Zn	Fe	Mn
Aus 1.3286 g Asche	0.19 mg.	0.28 mg.	0.962 mg.
pro 10,000 Individuen	4.328 mg.	6.378 mg.	21.910 mg.
In % der Asche	0.014	0.021	0.072 *

* Nach Herrn Dr. T. Watanabe (1919) enthielten die Kokons 0.298% Mn von der Asche (als Mn_2O_3 berechnet).

Dagegen gab es keinen nennenswerten Unterschied beim Fe- und Mn-Gehalt zwischen dem Kokon und der Seidendrüse. (Siehe Tab. XXI).

TABELLE XXI.

Zink-, Eisen- und Mangangehalt der Seidendrüsen.
(Japanische Rasse 107 ♀, 18/IX '33)

Individuen	Frishgewicht g.	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.
150	121.55	31.0816	1.1444

	Zn	Fe	Mn
Aus 1.1444 g Asche	0.69 mg.	0.12 mg.	0.444 mg.
pro 10,000 Individuen	46.0 mg.	8.0 mg.	29.6 mg.
In % der Asche	0.060	0.011	0.039

Der im Vergleich mit ihrem Sekret, dem Kokon ausserordentlich hohe Zn-Gehalt in den Seidendrüsen, die zur Bildung des Seidenfibroins sowie Sericins tätig sind, deutet die physiologische Rolle des Zinks im Seidenspinner gut. In diesem Zusammenhang ist die Angabe von Herrn Dr. M. Ono (1936), die er aus den Ergebnissen des Herrn Dr. J. Machida (1926) ausgewertet hat, sehr interessant. Danach beträgt das Volumen der drüsenzelligen Gewebe beinahe 50% des gesamten Volumens der Seidendrüsen.

Wie ich schon mitteilte (Akao 1935), steht der Zn-Gehalt in der Hämolymphe in engerer Beziehung zu der Entwicklung der Geschlechtsorgane. Durch weitere Untersuchungen wurde festgestellt, dass in der Hämolymphe Zn unter den wichtigsten

katalytischen Elementen mengenmässig am grössten war, ihm folgen dann Fe und Cu. Mn war dagegen nur gering oder sogar nur ein hunderstel der Zn-Menge in der Hämolymphe. (Siehe Tab. XXII).

TABELLE XXII.

Die verschiedenen Aschenbestandteile der Seidenspinnerhämolymphe.

(Japanische Rasse 107 ♀, 15 & 17/VI '33)

a) 15/VI '33.

Wachstumsstadium	Trockengewicht g.	Aschengewicht g.
2. Tag des Puppenstadiums	19.5182	2.0966

	Zn	Fe	Mn	Cu
Aus 2.0966 g. Asche	1.58 mg.	0.467 mg.	0.027 mg.	0.25 mg.
pro 1 kg Trockengewicht	80.96 mg.	23.93 mg.	1.383 mg.	12.79 mg.
In % der Asche	0.075	0.022	0.0013	0.012

b) 17/VI '33.

Wachstumsstadium	Trockengewicht g.				Aschengewicht g.		
4. Tag des Puppenstadiums	25.7180				2.7476		

	Na	K	Ca	Mg	Zn	Fe	Mn
Aus 2.7476 g Asche.	mg. 59.303	mg. 476.32	mg. 134.34	mg. 207.14	mg. 3.36	mg. 0.70	mg. 0.0328
pro 1 kg. Trockengewicht	g. 2.306	g. 18.523	g. 5.346	g. 8.056	mg. 130.65	mg. 27.22	mg. 1.275
In % der Asche	2.18	17.33	4.89	7.54	0.122	0.026	0.0012

Aus den oben mitgeteilten Ergebnissen lässt sich also der Schluss ziehen, dass das Zink im allgemeinen an dem Ort, wo die Zelltätigkeit lebhaft vor sich geht, immer vorhanden ist, um dort eine grosse Rolle im biologischen Geschehen zu spielen. Die Behauptung der Schüler G. Bertrands wurden durch diese Unter-

suchung bestätigt aber muss erweitert werden.

Da sowohl die Ovarien als auch die Eier verhältnissmässig reich an Mn sind, steht Mn in einer besonderen Beziehung zur Geschlechtsfunktion des Seidenspinners, für sein Wachstum aber hat Mn höchstwahrscheinlich ganz andere Bedeutung als Zn. Für diese Annahme spricht der Reichtum an Mn in solchen Körperteilen, z. B. Eischale, abgestossener Haut und Sekret (Kokon) u.a.m., die mit der Lebenstätigkeit nicht direkt zusammenhängen.

Die Frage, in welcher Form Zn im Seidenspinner sich finden kann, ist zwar noch ganz offen, aber man könnte soweit spekulieren, dass Zn nicht mit einem Porphyrin, sondern möglicherweise mit Eiweiss in Verbindung steht. Denn Zn-Porphyrin ist, wie mir freundlicherweise die Herren H. Fischer und Keilin persönlich mitteilten, sehr labil.

Der Menge nach ist Eisen nach dem Zink das nächst wichtige katalytische Element. In der Hämolymphe betrug es weniger als ein Drittel des Zinks, in der abgelegten Haut und dem Kokon gab es grössere Mengen Fe als Zn, in den Seidendrüsen dagegen bedeutend weniger als Zn und Mn.

Wie oben erwähnt, waren die Eier sowie die frisch ausgekrochenen Raupen besonders reich an Fe. Nach den Untersuchungen von Keilin über das Cytochrom (1925) ist es keine Frage, dass Fe in der Physiologie der Insekten eine grosse Rolle spielt. Wie viele Teile des Eisens im Seidenspinner auf das Cytochrom entfallen, kann noch nicht beantwortet werden.

Darüber, welche Rolle das Kupfer in der Insektenphysiologie spielt, besteht noch keine bestimmte Theorie. Bedenkt man aber, dass Cu relativ konzentriert in der Hämolymphe, den Eiern und den frisch ausgekrochenen Raupen als auch in den Puppen enthalten ist, muss man mit Recht glauben, dass das Kupfer ähnlich wie Zn, Fe, Mn irgendeine wichtige Bedeutung in der Insektenphysiologie hat.

Es steht aber auf jeden Fall ausser Frage, dass Zn, Fe, Mn, Cu die wahren konstanten Bestandteile der katalytischen Elemente des Seidenspinners sind.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Viele Wachstumskurven, welche in bezug auf Frisch-, Trockensubstanz, Asche, C, H, Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn und Cu die ganze Lebensdauer des Seidenspinners hindurch gewonnen sind, wurde angegeben.

2. Die einzelne Wachstumskurve als ganzes zeigt eine eigentümliche Spezifität, die auf die physiologischen Bedeutung des betreffenden Stoffes deutet.

3. Beim Betrachten der Wachstumskurve ist zu bemerken, dass sie die Abhängigkeit der Gehaltsänderung des betreffenden Stoffes sowohl von dem Fütterungs- als auch von dem Wachstumszustand darstellt. Diese Abhängigkeit des einzelnen Stoffgehaltes von dem Wachstumszustand ist biochemisch sehr interessant in der Hinsicht, dass die aktiven Körperbestandteile und die von ihnen produzierten Stoffe sich in jeder Wachstumsstufe in verschiedenen Mengenverhältnissen finden und solche Tatsache uns die biologische Rolle des betreffenden Stoffes andeutet.

4. Bei den frisch ausgeschlüpften Raupen zeigten Zn-, Fe- und Cu-Gehalt ihre höchsten Werte während des ganzen Wachstums; im Gegensatz dazu ergab der Aschen-, Na-, K-, Ca-, und Mn-Gehalt seine kleinsten Werte; ganz verschieden von den übrigen formbildenden Elementen, zeigte der Mg-Gehalt seinen höchsten Wert während des jüngeren Stadiums. Dieses besondere Verhalten des Magnesiums zusammen mit seinem Höchstwert bei der Verpuppung muss weiter untersucht werden.

5. Die Verteilung der verschiedenen Aschenbestandteile in Seidenraupen, Puppen, Kokons, Eier u.s.w. wurde untersucht. Für Ca wurden in der abgelegten Haut und im Kokon besonders hohe Werte erhalten, und der mögliche Zusammenhang des Ca-Bestandes mit dem physiologischen Verlauf des Seidenspinnerwachstums wurde diskutiert. Unter den katalytischen Elementen wurde Zn besonders konzentriert an dem Ort, wo die Lebenstätigkeit lebhaft vor sich geht, z. B. in den Seidendrüsen, Eierstock, dem embryonalen Anteil des Eies (frisch ausgekrochene Raupe), Hämolymphe u.a. gefunden, im Gegensatz dazu wenig im Kokon sowie in der abgelegten Haut.

Ganz umgekehrt verhielt sich das Mn. Sehr konzentriert war es im Kokon und der abgelegten Haut, sehr wenig im Embryo (frisch ausgekrochene Raupe) und in der Hämolymphe.

Die physiologische Verteilung des Zn und des Mn im Seidenspinner ist voneinander ganz abgetrennt. Deshalb darf man wohl annehmen, dass diese beiden katalytischen Elemente eine ganz von einander getrennte Rolle in der Seidenspinnermetamorphose spielen.

6. Vier katalytische Elemente (Fe, Zn, Mn, Cu) wurden im Seidenspinner nach der folgenden Reihenfolge quantitativ nachgewiesen.



Diese Reihenfolge unterscheidet sich auffällig von der bei den Säugetieren gefundenen.

LITERATUR.

- Akao, A. (1930): J. Chosen Med. Association, **20**, 1-13.
 „ (1931 a): Ebenda, **21**, 762-68.
 „ (1931 b): Ebenda, **21**, 928-33.
 „ (1932 a): Keijo J. Med., **3**, 250-61.
 „ (1932 b): Ebenda, **3**, 360-74.
 „ (1932 c): Chôsen-Kwagakukwai-Kwaihô, **3**, 45-56.
 „ (1932 d): Ebenda, **3**, 95-100.
 „ (1935): J. Zool. Soc. Japan, **47**, 159-63.
 „ (1935): Keijo J. Med., **6**, 49-60.
 Aronsohn, Fr. (1911): C. R. Acad. Sci. Paris, **152**, 1183-84.
 Bertrand, G. (1911): Bull. Soc. Chim. France Ser. 4, Tom. 9.
 Bertrand, G. and Vladesco, R. (1921): C. R. Acad. Sci. Paris, **173**, 54-55.
 Bito, Sh. (1927): J. Agric. Chem. Soc. Japan, **3**, 921-26.
 Bunge, G. (1889): Z. Physiol. Chem., **13**, 399-406.
 „ (1892): Ebenda, **16**, 173-86.
 Délézenne, C. (1919): Ann. Inst. Pasteur, **33**, 68-136.
 Demjanowski, S. and Prokoffjeva, E. (1935): Biochem. Z., **275**, 455-63.
 Fujii, O. (1926): J. Agric. Chem. Soc. Japan, **2**, 371-84.
 Griffiths, A. B. (1892): Proc. Roy. Soc. Edinburgh, **19**, 116-30.
 Guillaumin, M. Ch. O. (1932): Bull. Soc. Chim. Biol., **14**, 85-196.
 Guillemet, R. (1932): Bull. Soc. Chim. Biol., **14**, 1350-85.
 Haber, V. R. (1926): Bull. Brooklyn Entom. Soc., **21**, 61-100.

- Hiratsuka, E. (1917): Sangyô-Sinkenjô-Hôkoku, **2**, 353-412.
 „ (1920): Bull. Imper. Exper. Sericult. Station, Japan, **1**, 257-315.
 Kawase, S., Iwaoka, S. and Saito, R. (1913): J. Sci. Agric. Soc. Tokyo (Nôgaku-Kwaihō), **136**, 21-41.
 Keilin, D. (1925): Proc. Roy. Soc. London, Ser. B., **98**, 312-39.
 Koga, A. (1934): Keijo J. Med., **5**, 97-105.
 Kojima, K. (1930): Nagoya J. Med. Sci., **5**, 49-61.
 Kramer, B. and Gittleman, I. (1924): J. Biol. Chem., **62**, 353-60.
 Kuroda, K. (1934): Keijo J. Med., **5**, 151-64.
 Kuwana, Zy. (1937): Japan. J. Zool., **7**, 373-403.
 „ (1937): Bull. Imper. Sericult. Exper. Station, Japan, **9**, 35-62.
 Machida, J. (1926): Bull. Imper. Sericult. Exper. Station, Japan, **7**, 241-62.
 Maquenne, L. (1921): Bull. Soc. Chim. France, **29**, 585 (Zitiert aus Chem. Abstr., **15**, 3429).
 Maquenne, L. and Demoussy, E. (1919): C. R. Acad. Sci. Paris, **168**, 489-92.
 Muttkowski, R. A. (1921): Trans. Americ. Entom. Soc., **40**, 144-57.
 „ (1921): Science, **53**, 453-54.
 „ (1921): Ann. Entom. Soc. Americ., **14**, 150-56.
 Nagaoka, T. (1909): Dainihon Sansikwaihō, **203**, 15-17; **205**, 30-33; **206**, 20-22; **207**, 24-26; **208**, 23-26; **209**, 31-34. (Zitiert aus Sansigaku-Zassi, **10**, 145-46, 1937).
 Ono, M. (1936): Oyô-Dôbutsugaku-Zassi **8**, 262-67. Loc. cit. Fussnote von S. 264.
 Ozaki, J. (1936): Research Bull. Imper. Tokyo Sericult. College, **1**, 126-55.
 Perietzeauuu, D. J. (1926): Thèses Paris.
 Pope, T. H. (1932): Analyst, **57**, 709-14.
 Ryo, T., Kuroda, K., Asano, A., Hiraoka, Y., Itinosawa, I. and Watanabe, T. (1934): Chôsen Kwagakukwai-Kwaihō, **5**, 127-43.
 Sarata, U. (1933): Japan. J. Med. Sci. II. Biochemistry, **2**, 247-60.
 Schmidt (1906): Z. Analyt. Chem., **45**, 512. (Zitiert aus Treadwell Analyt. Chem. Bd. 2, 58-59, 1923).
 Shikata, M., Tachi, I. and Hozaki, N. (1927): J. Agric. Chem. Soc. Japan, **3**, 833-40.
 „ „ „ (1927): Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, **3**, 52-53.
 Uvarov, B. P. (1928): Trans. Entom. Soc. London, 255-343.
 Watanabe, T. (1919): Bull. Imper. Sericult. Exper. Station, Japan., **5**, 1-40.



BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XLIX. Submaxillary Mucin and Mucoid.

By

YASUHISA TANABE.

*(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)*

(Received for publication, February 13, 1939)

In a previous paper (Tanabe, 1938) it was suggested that sublingual mucin is identical with the submaxillary. The writer collated his own analytical figures on the former with those obtained by Blix on the latter by means of different methods. In order to establish the identity more exactly, the writer prepared and investigated the submaxillary mucin, employing thoroughly the procedures which had been used for the sublingual. The figures obtained, to be given in this account, will demonstrate that the substances from both sources resemble each other well within the discrepancy which is allowed for such kinds of preparations.

It will be seen that the connection is also the same between the mucoid specimens from these glands.¹⁾

As regards the data on the sublingual mucin and mucoid, see the publications enumerated in the bibliography.

EXPERIMENTAL.

Preparation.

Submaxillary mucin and mucoid were isolated and purified as were the sublingual. 17 gm. of mucin and 0.7 gm. of mucoid were obtained on the average from 1 kilogram of the tissue.

Qualitative assays.

The results of protein tests on the preparations were exactly similar to the corresponding glycoproteins from the sublingual

gland. Phosphorus was not detected. In both the mucin and mucoid, the aniline acetate and naphthoresorcinol tests suggested the presence of uronic acid, although not distinctly. They produced a red colour with Ehrlich's reagent, not only when the alkaline solution had been heated previously but also when not heated (Blix's test).

Quantitative analyses.

The quantitative data are listed in Table I.

TABLE I.
Analyses of submaxillary mucin and mucoid.
Figures express the contents in per cent.

Analyses	Mucin			Mucoid	
	Prep. I	Prep. II	Prep. III	Prep. I	Prep. II
Nitrogen	12.8	12.6	12.7	11.3	10.2
Total reduction, after acid hydrolysis ¹⁾ , as glucose	17.6	17.1	17.4	22.2	24.3
Carbohydrate reduction, as glucose					
i) without previous alkaline treatment	13.2	12.5	12.9	17.4	19.1
ii) with previous alkaline treatment	16.1	16.0	15.7		
Glucosamine ²⁾	13.1	12.9	13.1	19.5	20.8
Glucuronic acid, by the furfural method	3.9	4.8	4.7	5.4	6.5
Ordinary sugar as glucose	2.5 ³⁾ (2.1-2.7)	2.6 ³⁾ (2.2-3.0)	2.7 ³⁾ (2.4-3.2)		
as galactose				4.4	4.3
CH ₃ CO	6.6	7.0	7.0	8.9	9.2
Sulfate-S	0.01	0.01	0.02	0.06	0.07
Ash	0.28	0.28	0.32	2.9	2.1

1) The duration of acid hydrolysis: 3 hours.

2) The numbers, 10.3, 10.6 and 10.5, which expressed the glucosamine contents in per cent of the preparations of sublingual mucin in the 33rd paper of this series of investigation, were errors in manuscript for 12.3, 12.6 and 12.5.

3) Average values of the three colorimetric reactions (the second procedures of the Masamune-Tanabe method). The figures in parentheses show the maximal (the values by the orcinol reaction) and the minimal (the values by the indole reaction) values.

The mucin (Prep. I) and mucoid (Prep. II) reduced, as such, ferricyanide to the extent of 9.9%¹⁾ and 18.1% each of glucose.

By the fractionation method of Masamune and Tanabe (the second procedure), the ordinary sugar of the mucoid was shown to be galactose; whereas, in the mucin, more than one ordinary sugar was shown to exist, because the colour intensities by the three reactions were not in accord with one another, when expressed as any of the hexoses.

Typical examples will be given below.

a) The mucin.

Prep. III was adapted. The final solution corresponded to 0.49% solution of the mucin.

Reaction	Colorimetric reading mm	Conc. (%) of the ordinary sugar in the final solution, expressed as:		
		Galactose	Mannose	Glucose
Orcinol	15.1	0.0118	0.0120	0.0155
Indole	17.3	0.0150	0.0168	0.0118
Diphenylamine I.	15.4	0.0215	0.0168	0.0123

b) The mucoid.

Prep. II was taken. 1 cc. of the final solution corresponded to 5.4 mg of the preparation.

Reaction	Colorimetric reading mm	Conc. (%) of the ordinary sugar in the final solution, expressed as:		
		Galactose	Mannose	Glucose
Orcinol	8.4	0.0233	0.0250	0.0358
Indole	12.4	0.0225	0.0245	0.0165
Diphenylamine I.	14.0	0.0235	0.0135	0.0115

1) Reduction by a specimen of sublingual mucin was equivalent to 9.3% of glucose.

*Physical measurements.**The mucin.*

The substance (Prep. II) was dissolved in water by means of the least requisite quantity of dilute NaOH solution. pH of the solution thus prepared was 8.35 and concentration 1.0275%.

i) Optical rotation

$$[\alpha]_D^{23} = \frac{-0.22 \times 100}{1.0021 \times 1.0275 \times 1} = -21.4^\circ$$

ii) Specific refraction

$$\frac{(1.33475)^2 - 1}{(1.33475)^2 + 2} \cdot \frac{1}{0.9994} \cdot \frac{100}{1.0275} - \frac{(1.33268)^2 - 1}{(1.33268)^2 + 2} \cdot \frac{1}{0.9973} \cdot \frac{100 - 1.0275}{1.0275} = 0.276^\circ$$

The mucoid.

Prep. II was adapted as watery solution.

i) Optical rotation

Cone. of the mucoid in the solution was 1.013%.

$$[\alpha]_D^{18} = \frac{-0.13 \times 100}{1.0063 \times 1.013 \times 1} = -12.8^\circ$$

ii) Specific refraction

Cone. of the mucoid in the solution 1.0%.

Temp. was 12°C.

$$\frac{(1.33467)^2 - 1}{(1.33467)^2 + 2} \cdot \frac{1}{1.0038} \cdot \frac{100}{1.0} - \frac{(1.33315)^2 - 1}{(1.33315)^2 + 2} \cdot \frac{1}{0.9995} \cdot \frac{100 - 1.0}{1.0} = 0.203^\circ$$

The writer is much indebted to the Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant.

REFERENCES.

- Tanabe, Y. (1938): Journ. of Biochem., **28**, 227.
 Tanabe, Y. (1939, i): Journ. of Biochem. **29**, 387.
 Tanabe, Y. (1939, ii): Journ. of Biochem. **29**, 439.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

L. Prosthetic Group of Corneamucoid.

By

MASAMI SUZUKI.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, February 13, 1939)

Levene and López-Suárez¹⁾ placed the carbohydrate grouping of corneamucoid together with those of funis and vitreous mucins under a subgroup of mucoitinsulfuric acids in their classification; while Karlberg recently claimed it to be a polysaccharide made up of glucosamine and a kind of hexose, probably mannose, in the proportion of 1 to 1. He based his conclusions on analyses of his mucoid preparations, which contained 7.7% glucosamine and 8.0% "mannose", with only 0.3% S separable by hydrolysis.

Intending to clarify this problem, I at first prepared the mucoid in a like manner to Mörner, but started with tissue which had been first dried with alcohol, and made analyses according to the procedures of our laboratory. The results affirmed neither of the foregoing assertions as the preparations involved glucosamine and galactose in one equivalent ratio; and moreover, sulfate-S in the same ratio, whereas glucuronic acid was not found. Sulfur in the form of sulfate was said by Karlberg to have amounted only to 0.22 equivalent of glucosamine in his preparation. According to our experience, however, this inorganic radical, when combined with sugar, is cleft off with comparative difficulty, as already mentioned²⁾ and in addition at least 6 hours are required for the complete precipitation of BaSO₄. It is suspected accordingly, that Karlberg as well as Mörner who insisted on the complete absence

1) They isolated carbohydrate complexes directly from tissues not only from cornea but also from other kinds of animal material, throughout the whole of similar investigations.

2) The 31st communication.

of sulfate-S, may have not amplified these analytical conditions. In the second undertaking, I tried to isolate the carbohydrate complex from the mucoid by following the procedures of Levene and López-Suárez. Although the preparations obtained were not sufficiently pure, the constituents of the complex remained in them in the same proportions as in the mucoid. The equivalent ratios of nitrogen to sulfate-S were 2.76 and 3.42, resembling the corresponding relations in the specimens which Levene and López-Suárez assumed as mucoitinsulfuric acid without deciding if uronic acid, a characteristic constituent of itinsulfuric acid, were involved. These authors attributed the relative low content of sulfur to its instability in linking to the carbohydrate. The nitrogen values in their substances, on the contrary, seem to me too high, owing to the impurities containing this element.

It is interesting that the hexosamine-hexose complex which is free from glucuronic acid exists in some glycoproteins as an etherial sulfate similarly as has been well established in chondroitin and mucoitin.

Meyer and Palmer appended to one of their communications on glycoproteins a note saying that they could isolate from cornea a substance having the composition of mucoitin sulfuric acid. The details have not yet been published.

EXPERIMENTAL.

Preparation.

I. Mucoid.

The corneas (of cows' eyes) were removed from the sclera, and the *substantia propria* was separated from the epithelial layer and from Descemet's membrane mechanically, and then dehydrated by placing in 95% alcohol for several days. From 1440 corneas were thus obtained 90 gm. of dry discs.

The dry discs were sheared with scissors, and, after the addition of a thymol alcoholic solution, agitated in cold water¹⁾ (1300 cc.

1) Mörner employed potassium hydroxide solution and ammonical water besides water alone.

for 10 gm. of the material) with a stirrer for 5 days. The residue was extracted again for 3 days, by renewing the water; and to the combined extracts, which reacted neutrally, were added 30% acetic acid until the pH was lowered to 1.6. The deposits which appeared thereby were suspended in water (200 cc. when preparation was begun with 10 gm. of the material), dissolved by means of a dilute K_2CO_3 solution, the pH being maintained within 8.0, and reprecipitated with acetic acid, after centrifuging off the insoluble part. Purification was repeated once more in a like manner, but this time, alkali was not required for dissolution. The substance was then washed with alcohol and ether and finally dried in vacuo over P_2O_5 . The yield of Prep. I (from 10 gm. of dry material) was 150 mg and that of Prep. II (material: 31 gm.) was 0.6 gm. To add an explanatory remark, the mucoid formed no slimy solutions in water and was precipitated always in the form of flock, as Mörner observed. Precipitation occurred more easily in the presence than in the absence of sodium chloride, which is just the reverse of the case of funis mucin.

II. *The carbohydrate grouping.*

Separation was carried out on the principle which Levene and López-Suárez adapted for isolating it from tissue, except that in the final stage the product was treated further with chloroform and amylalcohol, as follows:

300 mg of the mucoid were taken up in 20 cc. of 1.5% NaOH solution and stood at room temperature. After 3 days, the solution was acidulated with 30% acetic acid and heated with an excess of $BaCO_3$ powder on a bath for 2 days, with occasional agitation. Water was added from time to time, and it was finally centrifuged. The substance in view was then precipitated from the supernatant brownish liquid with 30 volumes of glacial acetic acid. The deposit was washed 10 times with alcohol, kneaded with 3 cc. of chloroform for 2 hours, and thereupon 15 cc. of water and 1 cc. of amylalcohol were further added, followed by shaking for 12 hours. After centrifuging the mixture, the substance was precipitated from the watery layer, as mentioned above, with glacial acetic acid, washed

with alcohol and ether and dried in vacuo (Prep. I). A crop of 40 mg was obtained.

Prep. II was prepared from 0.5 gm. of the mucoid and the yield amounted to 50 mg.

Qualitative Tests.

I. The mucoid.

Biuret, xanthoprotein, Millon, Sakaguchi, diazo and Molisch (deep reddish-violet coloration) tests were all positive. Hopkins-Cole and Morse reactions were negative.

It was precipitated faintly by ammonium sulfate (at half saturation), mercuric acetate, mercuric chloride and tannic acid and markedly by phosphotungstic acid and trichloroacetic acid, while not by ferricyanide-acetic acid. Heat coagulation did not take place.

It was free from phosphorus. Although in a slight degree, Blix's test for amino-sugar was given immediately without previous heating of its alkaline solution. Naphthoresorcinol and aniline acetate tests for uronic acid were negative.

II. The specimens of the carbohydrate grouping.

Biuret was given. The Molisch test gave a reddish violet colour. Naphthoresorcinol and aniline acetate tests were negative.

Quantitative Analyses.

Analytical data of the mucoid will be listed in Table I.

In these specimens less nitrogen was contained than in Mörner's (12.63–12.97%) as well as in Oldfeldt's (13.0–13.8%). For preparation, the tissue was treated here in advance with alcohol, as in the case of funis mucin.¹⁾ Therefore, for the same reason as stressed there, the present specimens are considered purer than those of the previous authors. Correspondingly, with respect to the carbohydrate content, these specimens surpassed conspicuously Karlberg's, which like those of Mörner and of Oldfeldt,

1) The 46th paper of this series of investigation (Suzuki, 1939).

TABLE I.
 Analyses of corneamucoid.

Analyses	In per cent		Expressed as equivalents per equivalent weight	
	Prep. I	Prep. II	Prep. I	Prep. II
Nitrogen	11.39	11.70		
Total reduction ¹⁾ , as glucose	38.23	37.57		
Carbohydrate reduction ¹⁾ , as glucose	24.12	24.03		
Glucosamine	12.88	12.26	1.00	1.00
Galactose				
i Diphenylamine method I	12.86	12.76		
ii Indole method	12.74	12.89		
iii Orcinol method	12.86	12.89		
mean	12.82	12.85	0.99	1.04
Acetyl	3.28	3.04	1.06	1.03
Sulfate-S	1.87	1.99	0.81	0.91
Ash	3.49	3.42		

1) Duration of acid hydrolysis: 3 hours.

had been separated from fresh tissue.

The ordinary sugar was identified with galactose colorimetrically by the method repeatedly employed means in this laboratory. When expressed as mannose or glucose, the figures calculated from the intensities of coloration were not coincident. Next, in each of the preparations the carbohydrate reduction was in fair agreement with the total sum of the reducing forces calculated from galactose and glucosamine contents. The latter were in Prep. I, 24.08¹⁾ and in Prep. II, 23.44%¹⁾ as glucose. These findings and the negative result of naphthoresorcinol test all deny the existence of uronic acid.

Finally the amino-sugar, galactose and acetyl were found to be

$$1) \quad 12.82 \times \frac{500}{614} + 12.88 \times \frac{650}{614} = 24.08 \quad \text{and} \quad 12.85 \times \frac{500}{614} + 12.26 \times \frac{650}{614} = 23.44$$

The relative reducing forces of galactose and glucosamine to glucose were derived from the experimental values of Masamune and Tanabe (1938).

present in an unequivalent proportion. Sulfate-S amounted to a little less than the equivalent, but the divergencies were within analytical error.

Conclusively it may be said that the prosthetic group of the cornea mucoid is taken up by a sulfuric ester of an equimolecular complex of acetylglucosamine and galactose.

Analyses of the preparations of the carbohydrate complex gave figures embodied in Table II.

TABLE II.
Analyses of preparations of the carbohydrate grouping.

Analyses	In per cent		In equivalents per equivalent weight	
	Prep. I	Prep. II	Prep. I	Prep. II
Nitrogen	5.71	5.90	2.76	3.42
Total reduction ¹⁾ , as glucose	52.50	47.22		
Carbohydrate reduction ¹⁾ , as glucose	48.14	43.75		
Glucosamine		22.05		1.00
Galactose				
i Diphenylamine method I	26.60	21.96		
ii Indole method	26.60	21.96		
iii Orcinol method	26.83	22.22		
mean	26.68	22.05	1.00	1.00
Acetyl		6.04		1.14
Sulfate-S	4.42	3.61	0.93	0.92
Ash		10.91		

Levene and López-Suárez's preparations: 3.93% N and 2.27% sulfate-S (equivalent ratio of N to S: 3.96 to 1.00), and 4.62% N and 3.10% sulfate-S (equivalent ratio of N to S: 4.76 to 1.00).

1) Duration of hydrolysis: 3 hours.

The products still showed positive biuret reaction, owing to the insufficient strength of the alkali which was employed for cleaving off the protein part. The lack of material did not allow a further attempt with stronger alkali. Nevertheless, it is worth

noting that the mutual relationships among the components of the assumed carbohydrates remained so by the alkaline treatment, notwithstanding the marked reduction of nitrogen belonging to the protein fragment. The mutual relations among them would have been altered, if the carbohydrate grouping had not been made up of a single polysaccharide.

I also attempted to isolate the carbohydrate complex directly from the tissue as did Levene and López-Suárez. But the product appeared to involve more than one ordinary sugar because the reactions by means of orcinol, indole and diphenylamine gave colours of intensities which did not agree with one another, when expressed as any of the hexoses.

The Foundation for the Promotion of Science and Industrial Research of Japan gave a grant towards the cost of this research, which is gratefully acknowledged.

REFERENCES.

- Karlberg, O. (1936): Hoppe-Seyler's Zeits. f. Physiol. Chem., **240**, 55.
Levene, P. A. and López-Suárez, J. (1918): Journ. of Biol. Chem., **36**, 105.
Meyer, K. and Palmer, J. W. (1936): Journ. of Biol. Chem., **114**, 689.
Mörner, C. Th. (1894): Hoppe-Seyler's Zeits. f. Physiol. Chem., **18**, 213.
Oldfeldt, Carl-Olof (1936): Hoppe-Seyler's Zeits. f. Physiol. Chem., **240**, 249.



BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

LI. Carbohydrate Grouping of the Mucin from the Vitreous Humor.

By

MASAMI SUZUKI.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, February 13, 1939)

As is customary in this laboratory, an investigation of this subject was also made, first on the mucin and then on the carbohydrate separated from it. Levene and Meyer tried with their co-workers to isolate the latter directly from the humor. But first, polysaccharides in animal tissues, other than glycogen, are not all regarded as conjugated with proteins,¹⁾ and second, in some of the glycoproteins more than one kind of carbohydrate¹⁾ are involved. Consequently neither of the substances obtained by the authors mentioned above is assumed to be the prosthetic group in search or, if it be so, to take up alone the whole of this part.

The mucin is scarcely precipitated from the fresh humor by simple acidification. Therefore, Mörner²⁾ diluted the humor 2 to 6 times before treatment with acetic acid, while Young²⁾ criticized the dilution as of little effect³⁾ and recommended either to use liquor 3 or 4 days old or to boil it, while fresh, in order to change the "acid-soluble mucinogen" into mucin. The writer found it easily separable if one collects the alcohol-precipitable substances from the vitreous humor and acidulates the watery extract. The

1) The readers are referred to the 37th, 39th, 43rd and 47th communications of this series of investigation (Hisamura 1938 i and ii, Tanabe 1939, and Suzuki 1939 ii).

2) Literature before Mörner and Young was reviewed comprehensively by these authors.

3) The writer substantiated what he said.

preliminary alcoholic treatment not only removes mineral salts which hinder the mucin from precipitation by acid, but also denatures or makes insoluble the proteins which act as protective colloids.

Preparations obtained by the new process contained less nitrogen than those of Mörner and of Oldfeldt. The purity of the preparations seemed the same as in the cases of funis mucin and corneamucoid (Suzuki 1939 i and iii). The relationships among carbohydrate-reduction, glucosamine, glucuronic acid and acetyl were like those in funis mucin. Sulfate-S was either absent completely or so scanty that it was an impurity. No ordinary sugar was found. The results suggested that mucosin from funis mucin constitutes the sole ingredient of the prosthetic group. The preparation showed a neutral equivalent and optical rotation identical to those of the carbohydrate from funis mucin (Suzuki 1938). Regarding the prosthetic group of this mucin, the writer could not agree with Karlberg who thought it composed of glucosamine and "mannose".

EXPERIMENTAL.

Preparation.

I. The mucin from vitreous humor.

The vitreous humor was dissected out from fresh ox eyes and added to 5 volumes of alcohol (95%), after being filtered through a cotton gauze. The deposit was separated, washed with alcohol and ether and dried in vacuo at room temperature. 30 mg of dry powder were obtained, on the average, from one eye. In the next stage, the material was submitted to extraction by placing in cold water (300 cc. of water when 2 gm. of the powder were used) in an ice chest over night. The residue was extracted twice more with decreasing volumes of water (200 and 100 cc. in the example). The extracts were combined and filtered through a Büchner funnel, and the viscid filtrate was acidified by means of 30% acetic acid to pH 2.0 in order to precipitate out the mucin. It was not soluble in an excess of acetic acid, while the addition of sodium

chloride was seen to interfere with it in falling out. The crude product was further taken up in water and dissolved by means of the least requisite quantity of dilute K_2CO_3 solution¹⁾ and deposited again with acetic acid. The substance was redissolved and reprecipitated, finally washed with alcohol and ether and dried in vacuo over P_2O_5 .

Specimen I: Started with 2 gm. of the dry powder. The combined extracts reacted feebly alkaline (pH 7.6). Yield, 400 mg.

Specimen II: 4 gm. of the dry material was used. Care was taken to keep the extracting water neutral by the occasional addition of dilute acetic acid. Yield, 800 mg.

Specimens III and IV: Prepared as was Sp. I. The materials employed were 5 gm. and 1 gm. and the yields were 1.0 and 2.0 gm. respectively.

All of these preparations formed viscous solutions when dissolved in water with the aid of an alkali.

II. The carbohydrate grouping.

The procedures adopted to separate mucoitin from funis mucin were employed and a product weighing 70 mg was obtained from 200 mg of Sp. II of the mucin.

Qualitative Tests.

I. Mucin.

It gave positive biuret, xanthoprotein, Millon, Sakaguchi and diazo (orange red) tests. Hopkins-Cole and Morse tests were negative. All the specimens gave by the Molisch reagents the green coloration characteristic of uronic acid, but Sp. I, III and IV, in preparation of which the watery extracts became a little alkaline, showed a reddish layer besides the green stratum; although the ordinary sugar contaminants could be only very small, when judged from the results of orcinol and indole reactions (see below).

Ammonium sulfate (at half saturation) and mercuric chloride

1) pH was not shifted beyond 8.0.

produced turbidity, while mercuric acetate, phosphotungstic acid, trichloroacetic acid and tannic acid precipitated it well. Potassium ferriocyanide (+acetic acid) did not cause any precipitation at all. Heat coagulation was not producible.

Phosphorus was absent.

Naphthoresorcinol (Neuberg and Saneyoshi) and aniline acetate tests were given.

Blix's test for aminosugar was shown immediately without previous heating of alkaline solution of the substance.

Quantitative Estimations.

The data on mucin will be embodied in Table I and those on the carbohydrate grouping in Table II.

TABLE I.
Mucin from the vitreous humor.

Analyses	In per cent				In equivalents per equivalent weight			
	Sp. I	Sp. II	Sp. III	Sp. IV	Sp. I	Sp. II	Sp. III	Sp. IV
Nitrogen ¹⁾	10.09	10.04	9.68	10.03				
Total reduction ²⁾ , as glucose	41.66	43.57	45.16	42.99				
Carbohydrate reduction ²⁾ , as glucose	34.09	34.40	34.52	33.80				
Glucosamine	22.71	21.58	22.60	22.91	1.00	1.00	1.00	1.00
Glucuronic acid								
i Furfural method	24.27	23.11	24.34	24.27				
ii Indole method	25.31	24.55	24.00	25.66				
iii Orcinol method	24.68	24.01	24.09	25.78				
(mean)	24.75	23.89	24.14	25.24	1.00	1.02	0.98	1.02
Acetyl	5.06	5.47	5.94	5.25	0.93	1.06	1.09	0.95
Sulfate-S	0.16	0.26	0.24	0.0	0.03	0.07	0.05	0.0
Ash	0.69	0.49	0.50					

1) Mörner: average 12.27%; Oldfeld: 12.7 and 12.8%.

2) Time of hydrolysis: 3 hours.

It would be superfluous to comment on the figures, because a glance shows that the carbohydrate has the composition of

STUDIES ON THE BEHAVIOURS OF GLYCOGEN AND LIPIDS UNDER VARIOUS NUTRITIONAL STATES.

By

KORENORI OHNO.

*(From the Biochemical Laboratory, Institute for Research in
Physical Education, Ministry of Education, Tokyo.)*

(Received for publication July 10, 1939)

With the purpose of studying the metabolism of carbohydrates and lipids in animal organisms under various nutritional states, albino rats were fed on:

- 1) a diet deficient in vitamin B (vitamin B complex),
- 2) a diet consisting of particularly large amounts of one of three major food stuffs; i.e., carbohydrate, lipid and protein, and
- 3) a diet containing cholesterol in the proportion of 2 per cent

for certain periods. Then the content of glycogen and the fractions of biologically important lipids—phospholipid, cholesterol and fat—in various tissues and organs were determined simultaneously. The determination of the iodine number of phospholipid and fat were also carried out.

In this kind of experiment hitherto reported on by other workers, one may note that the carbohydrate and fatty constituents of tissues have been observed separately; for instance, one worker has determined only glycogen, while another worked on lipids alone. Of the lipids, phospholipid and cholesterol have often been observed separately; and experiments in which fatty constituents were determined simply by weighing the substances obtained into lipid solvents by extraction, may still be found in recent literature.

In the present experiment, the carbohydrate and lipid have not merely been studied simultaneously, but differential determinations of the various constituents of the lipids mentioned above

have also been made on the same materials.

Since the metabolisms of carbohydrate and of lipid are in close relationship, and since the metabolisms of different lipids are also interrelated, the principles applied in this communication are considered highly desirable for the present purpose.

EXPERIMENTAL ANIMALS AND THE METHOD OF FEEDING.

Male albino rats weighing between 50 and 70 grams were used. Previous to the experiment they were kept on a basal diet of unpolished rice and green vegetables for 10 days. Rats which showed normal growth during that period were divided into several groups of four to six each. Each rat was kept in a separate cage.

Basal diet group—Animals were fed on unpolished rice and vegetables. Water was given *ad libitum* in this and in other groups of rats, to be described below.

Vitamin B deficient diet group—A synthetic diet made after

TABLE I.
Composition of Diets.

Diet	Polished Rice Powder ("Sankyo")	Casein (for Chemical Use "Konishi")	Salts Mixture (McCullum, No. 185)	Cod Liver Oil ("Sankyo")	Dried Yeast incinalis "Shiono")	Lard (Adeps Suillus)	(Faex Med-Cholesterol "Merck")
Basal Diet	(As Basal Diet were used Unpolished Rice and Green Vegetables.)						
	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm
Vitamin-B Deficient Diet (V-B.D.D.)	84	10	4	2	0	10	0
Control Diet for V-B.D.D.	84	10	4	2	10	0	0
High Protein Diet	40	40	4	2	10	4	0
High Fat Diet	34	10	4	2	10	40	0
High Carbohydrate Diet	70	10	4	2	10	4	0
Cholesterol Diet	54	18	4	2	10	10	2

the prescription in Table I, containing no vitamin B (vitamin B complex), was given to the animals.

Control group for Vitamin B deficient diet—10 gm. of yeast (*Faex medicinalis*) were added to 100 gm. of the synthetic diet noted above.

High protein diet group—Animals taken for this group, and for the high fat, carbohydrate and cholesterol diet groups weighed between 60 and 70 gm. at the beginning of the experiments. They were fed with the basal diet for five days before the feeding with special diets was begun.

As the source of protein, casein (Casein for chemical use, Konishi & Co.) was added to the amount of 40 per cent. The composition of this diet as well as other special diets are tabulated in Table I.

High fat diet group—This diet contained 40 per cent of pig fat (*Adeps suillus*); that is, about 10 times as much fat as other diets.

High carbohydrate diet group—As the carbohydrate, polished rice powder (Sankyo Pharmacy) was added to the amount of 70 per cent. The amount of carbohydrate of this diet was accordingly twice as much as the others.

Cholesterol diet group—This diet contained 2 per cent of cholesterol (Merck) beside the other food constituents.

With these diets, the animals were fed for about 3–8 weeks as may be seen in Table II.

CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ANIMALS DURING THE FEEDING PERIODS.

The nutritional state of rats fed on diets containing Vitamin B, on B-deficient diets and on basal diets may be seen in the growth curves in Fig. 1-a.

The animals of the basal diet group weighed from 60–80 gm. at the beginning of the experiment. The increase in body weight of this group during the first four weeks was rather slow but it became significant during the next four weeks. At the end of the

Fig. 1.—a. Influence of Diets upon the Growth of Rats.

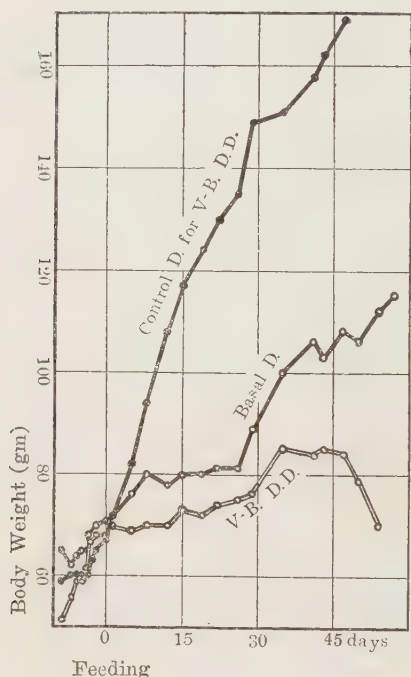
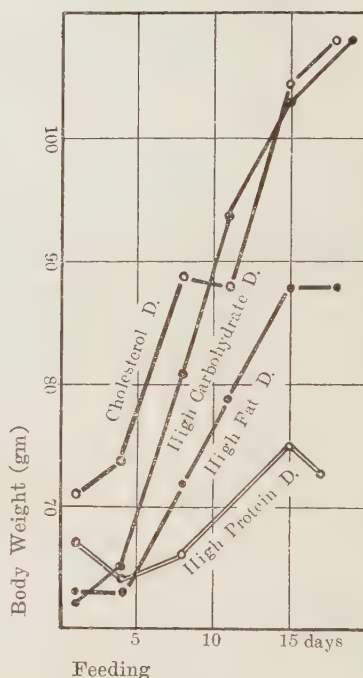


Fig. 1.—b. Influence of Diets upon the Growth of Rats.



experiment the animals reached an average weight of 115 gm.

The difference in weight between the vitamin B deficient diet and the control diet groups was striking, as might be expected; the former showed an average increase of about 15 gm. during the first five weeks, followed by a marked decrease. The average weight of this group at the 8th week was about the same as the initial body weight. The appetite and activity of the animals were naturally lessened by the vitamin B deficient diet; while the animals of the control group which received a diet containing 10 per cent of yeast as the source of vitamin B gained over 100 gm. during 7 weeks of feeding.

The influence of high protein, fat and carbohydrate diets on the growth of rats are also shown in Fig. 1-b.

Generally speaking, a high carbohydrate diet seems to give

the most favourable influence on growth, the high fat diet is less favourable, while the high protein diet retards growth to a significant extent. The addition of cholesterol to a diet, which otherwise had the usual composition of a synthetic diet (see Table I) appeared to have a favourable influence on the increase of body weight.

The animals were supplied with a sufficient amount of food on the day preceding dissection, so that a part of the diet remained in the cage when they were taken out for operation. Under anaesthesia by intraperitoneal injection of pernocton "Riedel", suitable amounts of skeletal muscle, liver, heart and brain were cut out for glycogen determination, and then liver, muscle and suprarenal gland were likewise removed for the lipid analysis.

METHODS OF ANALYSIS.

Glycogen determination—About 0.2 gm. of liver, 0.5 gm. of skeletal muscle, 0.5 gm. of heart muscle, and 0.5 gm. of brain were taken out as quickly as possible in the order mentioned, and put into a 10 cc. graduated centrifuge tube containing 1 cc. of 30 per cent KOH solution. The tube was heated on the steam bath for 30 minutes under a glass jar to bring the contents of the tube into homogeneous solution. About 3 times as much alcohol as KOH, and one drop of saturated watery solution of Na_2SO_4 , were added to precipitate the glycogen; then it was heated on the steam bath for a few minutes until the alcohol in the tube began to boil. The tube was centrifuged, the supernatant liquid rejected, and the precipitate of glycogen was washed first with about 3 cc. of alcohol and then with an equal amount of ether, each time being centrifuged. The wash ether was decanted, traces of it were completely removed by keeping the tube in the drying oven, then the glycogen precipitate, now free from contaminated decomposed products of tissue and solvents used for the separation of glycogen, was subjected to acid hydrolysis by heating with one normal H_2SO_4 in the steam bath for 2 hours. After cooling, the contents of the tube were transferred into a 25 cc. measuring flask, neutralized with diluted NaOH, and made up to the volume with water.

From this measuring flask, certain cc. were taken into another measuring flask to dilute the content of the first flask, so that 2 or 3 cc. of the contents of the second flask might contain an adequate amount of glucose for the subsequent application of the Hagedorn-Jensen method. The above method was based mainly on the principle of glycogen determination reported by Good, Kramer and Somogi (1933).

The determination of the lipid contents and their iodine numbers were done after the description of the accompanying communication in this journal (Yasuda and Ohno, 1939).

RESULTS OF THE EXPERIMENTS.

All the results of glycogen determination and of lipid analysis of various tissues are tabulated in Tables II-VII.

Glycogen content—The glycogen content of the liver was, on an average, 2.306 gm. per 100 gm. of liver when the animals were fed on a vitamin B deficient diet, while the value for the control animals was 3.528 gm. But the glycogen values of the liver varied to a somewhat large extent in both the vitamin B deficient and control diet groups, so that the difference of liver glycogen between the two groups did not seem striking.

When, however, the glycogen content was calculated on the whole liver instead of by percentage value, the influence of a vitamin B deficiency appeared so significant (0.065 and 0.223 gm. of glycogen respectively for vitamin B deficient and for control groups) that the statement that a Vitamin B deficiency causes a decrease in liver glycogen appeared reasonable. The average liver glycogen values of rats in the basal diet group was 3.970 gm. per 100 gm. of liver or 3.97 per cent, and the value calculated on the whole liver was 0.159 gm. indicating that these values are higher than those of the vitamin B deficient group, but lower than those of control groups.

The liver glycogen of animals in the high protein diet group was 1.731 gm. per 100 gm. of tissue, and the corresponding values of the high fat, high carbohydrate and cholesterol diet groups were

Glycogen and Lipids under Various Nutritional States. 357

TABLE II.
The Influence of Various Diets upon the Glycogen
Content of Different Tissues.

Diet	Rats No.	Period of Feeding	Final Body Weight	Weight of Liver	Liver to Body Weight	Glycogen Content of Moist Tissues (expressed in terms of glucose)				
						in whole Liver	in 100gm Liver	in 100gm Skeletal Muscle	in 100gm Heart Muscle	in 100gm Brain
Basal Diet			gm	gm		gm	gm	gm	gm	gm
	11	57	111	4.23	3.8	0.232	5.480	0.688	0.473	0.280
	12	57	95	3.44	3.6	0.111	3.240	0.720	0.478	0.252
	13	58	138	4.16	3.0	0.133	3.190	0.808	0.543	0.266
	Ave.		115	3.94	3.5	0.159	3.970	0.739	0.498	0.266
Vitamin-B Deficient Diet (V-B.D.D.)	23	52	69	3.86	5.6	0.071	1.830	0.573	0.304	0.241
	24	54	63	2.92	4.6	0.091	3.110	0.674	0.445	0.227
	25	54	57	2.16	3.8	0.077	3.550	0.368	0.318	0.211
	26	56	79	2.98	3.8	0.022	0.734	0.423	0.212	0.224
	Ave.		67	2.98	4.5	0.065	2.306	0.510	0.320	0.226
Control Diet for V-B.D.D.	31	55	138	5.06	3.7	0.211	4.170	0.617	0.453	0.249
	32	56	155	6.29	4.0	0.194	3.080	0.585	0.430	0.260
	34	53	183	7.38	4.0	0.298	4.030	0.570	0.284	0.235
	35	51	189	6.69	3.5	0.190	2.830	0.505	0.346	0.148
	Ave.		166	6.36	3.8	0.223	3.528	0.569	0.378	0.223
High Protein Diet	43	17	71	3.72	5.2	0.016	0.422	0.278	0.199	0.226
	44	19	82	4.19	5.1	0.128	3.070	0.603	0.386	0.199
	46	17	74	4.48	6.1	0.112	1.700	0.685	0.307	0.261
	Ave.		76	4.13	5.5	0.085	1.731	0.522	0.297	0.229
High Fat Diet	52	20	82	4.07	5.0	0.142	3.480	0.494	0.386	0.286
	53	19	73	3.94	5.4	0.086	2.180	0.612	0.299	0.225
	55	19	102	4.73	4.6	0.125	2.640	0.483	0.378	0.186
	56	18	97	5.69	5.9	0.052	0.906	0.519	0.248	0.224
	Ave.		89	4.61	5.2	0.101	2.302	0.527	0.328	0.230
High Carbo- hydrate Diet	61	19	105	5.05	4.8	0.179	3.535	0.660	0.326	0.186
	62	20	120	6.15	5.1	0.332	5.400	0.659	0.477	0.234
	64	20	110	4.84	4.4	0.148	3.070	0.591	0.611	0.212
	Ave.		112	5.35	4.8	0.220	4.002	0.637	0.471	0.211
Cholesterol Diet	72	18	111	6.11	5.5	0.274	4.480	0.591	0.352	0.248
	73	18	106	5.70	5.4	0.221	3.870	0.588	0.513	0.225
	Ave.		109	5.91	5.5	0.248	4.175	0.590	0.433	0.237

TABLE III.
Phospholipid Fraction of Tissues under Various Nutritional States.

Diet	Rats No.	Liver Phospholipid			Muscle Phospholipid	
		Content in whole Liver	Content in 100 gm Liver	Iodine No.	Content in 100 gm Muscle	Iodine No.
Basal Diet		mg	mg		mg	
	11	138.0	3250.0	100.8	932.0	102.3
	12	121.0	3510.0	99.8	925.0	100.3
	13	132.0	3180.0	102.5	908.0	102.5
	Ave.	130.3	3313.3	101.0	921.7	101.7
Vitamin-B Deficient Diet (V-B.D.D.)	23	129.0	3340.0	109.2	813.0	101.5
	24	78.0	2670.0	100.2	1100.0	102.5
	25	56.8	2630.0	103.5	1022.0	108.0
	26	97.8	3280.0	115.0	935.0	108.0
	Ave.	90.4	2980.0	107.0	967.5	105.0
Control Diet for V-B.D.D.	31	180.5	3570.0	120.0	1005.0	119.9
	32	222.0	3530.0	110.5	1110.0	108.5
	34	269.0	3650.0	104.5	946.0	110.8
	35	239.0	3570.0	110.5	964.0	113.5
	Ave.	227.6	3580.0	111.4	1006.3	113.2
High Protein Diet	43	120.2	3225.0	99.7	982.0	114.5
	44	147.3	3515.0	89.0	1038.0	116.5
	46	154.0	3440.0	102.1	1056.0	120.6
	Ave.	140.5	3393.0	96.9	1025.3	117.2
High Fat Diet	52	142.0	3491.0	100.2	876.0	111.8
	53	118.2	2996.0	100.5	908.0	108.8
	55	194.9	4120.0	98.5	1230.0	81.4
	56	203.0	3570.0	109.2	905.0	98.0
	Ave.	164.5	3544.2	102.1	979.8	100.0
High Carbo- hydrate Diet	61	195.4	3870.0	101.2	902.0	111.3
	62	201.0	3270.0	106.4	1048.0	106.0
	64	175.4	3630.0	104.3	1009.0	107.5
	Ave.	190.6	3590.0	104.0	986.3	108.3
Cholesterol Diet	72	194.2	3180.0	105.6	900.0	94.5
	73	189.9	3330.0	99.0	1020.0	91.2
	Ave.	192.1	3255.0	102.3	960.0	92.9

2.302, 4.002 and 4.175 gm. respectively. It is obvious that the highest glycogen content of the liver was caused by feeding on a high carbohydrate diet. The high protein diet seemed to have the most unfavourable influence on liver glycogen.

Compared with liver, the influence of various diets upon the glycogen content of other tissues, i.e. skeletal muscle, heart and brain were much less significant, as shown in Table II. Brain glycogen, in particular, does not seem to be influenced whatever diet may be used.

Phospholipid—In Table III are indicated the phospholipid content of liver and muscle under various nutritional states. The average values of liver phospholipid were 3313.3, 2980.0 and 3580.0 mg per 100 gm. of fresh tissue for the basal diet, the vitamin B deficient diet and its control diet groups respectively, showing that vitamin B deficiency caused a marked decrease in liver phospholipid. Since the weight of the liver in the B deficient diet group was greatly decreased, the difference of phospholipid content of the whole liver between the B deficient and the control groups was more marked than the percentage values.

High protein, fat, carbohydrate and cholesterol diets had little influence upon the percentage of liver phospholipid, being 3393.0, 3544.2, 3590.0 and 3255.0 mg per cent respectively.

The iodine number of liver phospholipid, too, was only slightly influenced. Regarding muscle phospholipid, the contents were 921.7 (basal diets), 967.5 (B deficient), 1006.3 (control), 1025.3 (high protein), 979.8 (high fat), 986.3 (high carbohydrate), and 960.0 mg (cholesterol diet) per 100 gm. of fresh moist muscles.

The phospholipid content of the suprarenal gland was slightly increased in the case of the B deficient diet group compared with the control group. Cholesterol feeding seemed to give a slight rise in the suprarenal phospholipid as indicated in Table VII.

Cholesterol—The free cholesterol content in liver was 156.7 mg per 100 gm. of fresh tissue in the basal diet group, and in the vitamin B deficient and control groups, were 173.8 and 195.1 mg per cent, showing that B deficiency decreases the cholesterol content in liver.

TABLE
Cholesterol Content of Tissues

Diet	Rats No.	Liver			
		Free Chole.		Bound Chole.	
		in Whole Liver	in 100 gm Liver	in Whole Liver	in 100 gm Liver
Basal Diet		mg	mg	mg	mg
	11	6.69	158.0	1.25	29.5
	12	5.11	148.5	1.20	35.0
	13	6.80	163.5	2.24	54.0
	Ave.	6.20	156.7	1.56	39.5
Vitamin-B Deficient Diet (V-B.D.D.)	23	6.70	173.5	1.70	44.0
	24	5.18	177.5	0.31	10.5
	25	3.77	174.6	0.54	24.9
	26	5.05	169.5	0.64	21.5
	Ave.	5.18	173.8	0.80	25.2
Control Diet for V-B.D.D.	31	9.20	181.5	2.40	47.5
	32	11.80	188.0	3.74	59.5
	34	15.24	206.5	2.18	29.5
	35	13.68	204.5	3.78	56.5
	Ave.	12.48	195.1	3.03	48.3
High Protein Diet	43	6.95	187.0	1.15	31.0
	44	8.16	195.0	0.67	16.0
	46	7.59	169.0	1.43	32.0
	Ave.	7.57	183.7	1.08	26.3
High Fat Diet	52	8.39	206.0	2.52	62.0
	53	8.24	209.0	2.32	59.0
	55	9.46	199.5	1.82	38.5
	56	13.54	238.0	3.07	54.0
	Ave.	9.91	213.1	2.43	43.4
High Carbohydrate Diet	61	9.53	188.5	1.46	29.0
	62	10.25	167.0	0.77	12.5
	64	8.99	186.0	0.77	16.0
	Ave.	9.59	180.5	1.00	19.2
Cholesterol Diet	72	16.90	277.0	118.60	1943.0
	73	16.00	281.0	131.00	2299.0
	Ave.	16.45	279.0	124.80	2121.0

IV.
under Various Nutritional States.

Cholesterol			Muscle Cholesterol			
Total Chole.		Per Cent of Free to Total Chole.	Free Chole.	Bound Chole.	Total Chole.	Per Cent of Free to Total Chole.
in Whole Liver	in 100 gm Liver		in 100 gm Muscle	in 100 gm Muscle	in 100 gm Muscle	
mg	mg		mg	mg	mg	
7.94	187.5	84.3	59.8	0.1	59.9	99.9
6.31	183.5	81.0	58.4	9.2	67.6	86.4
9.04	217.5	75.2	69.3	2.3	71.6	96.8
7.76	196.2	80.2	62.5	3.9	66.4	94.4
8.40	217.5	79.7	84.3	17.2	101.5	83.0
5.49	188.0	94.4	131.0	4.5	135.5	96.7
4.31	199.5	87.5	107.5	0.7	108.5	99.4
5.69	191.0	88.7	105.5	1.3	106.8	98.5
5.97	199.0	87.6	107.2	5.9	113.1	94.4
11.60	229.0	79.2	63.9	6.4	70.3	91.0
15.54	247.5	76.0	89.2	3.4	92.6	96.4
17.42	236.0	87.5	59.0	1.9	60.9	97.0
17.46	261.0	78.4	72.7	4.9	77.6	93.6
15.51	243.4	80.3	71.2	4.2	75.4	94.5
8.10	218.0	85.8	74.1	1.0	75.1	98.7
8.83	211.0	92.5	72.4	4.0	76.4	64.8
9.02	201.0	84.0	85.5	2.9	88.4	97.0
8.65	210.0	87.4	77.3	2.6	80.0	96.8
10.91	268.0	76.9	73.8	0.4	74.2	99.5
10.56	268.0	77.9	93.2	0.6	93.8	99.4
11.28	238.0	84.0	78.2	1.2	79.4	98.5
16.61	292.0	81.5	86.8	4.5	91.3	95.2
12.34	266.5	80.1	83.0	1.7	84.7	98.2
10.99	217.5	87.0	68.7	0.3	69.0	99.6
11.02	179.5	93.1	71.2	0.9	72.1	98.8
9.76	202.0	92.1	68.3	0.2	68.5	99.8
10.59	199.7	90.7	69.4	0.5	69.9	99.4
135.50	2220.0	12.5	80.2	2.8	83.0	96.6
147.50	2580.0	10.9	92.6	1.2	93.8	98.8
141.25	2400.0	11.7	86.4	2.0	88.4	97.7

In the high protein, fat, carbohydrate and cholesterol diet groups, free cholesterol of the liver was found to be 183.7, 213.1, 180.5 and 279.0 mg per cent. Free cholesterol of liver was therefore, increased by either high fat or high cholesterol diet to some extent.

Bound cholesterol in the liver was also lowered by vitamin B deficiency, being 25.2 mg per cent in the B deficient diet group and 48.3 mg per cent in the control group.

Of the high protein, fat, carbohydrate and cholesterol diets, the last mentioned caused an increase of the bound cholesterol in the liver to an exceptionally large extent. Nearly 100 times as much bound cholesterol was found in rats of this diet group as in those of other diet groups. An appreciable increase of bound cholesterol in the liver by the high fat diet was also observed.

The ratio of free to total cholesterol was between 80 and 90 per cent in all cases except that of the cholesterol diet group, in which most of the cholesterol was in bound form so that free cholesterol was only 11.7 per cent of the total cholesterol.

In skeletal muscles, the free cholesterol content was 62.5, 107.2 and 71.2 mg per 100 gm. of fresh tissue in the cases of the basal diet, the vitamin B deficient, and the control diet groups respectively. It appeared that the percentage value of free cholesterol increased when the animals were fed on a vitamin B deficient diet. Differences in the free cholesterol content due to the high protein, fat and carbohydrate diets were not significant in skeletal muscles. The Cholesterol diet did not increase the free cholesterol in muscle either.

The bound cholesterol content in muscles was very low, and differing from the case of the liver, was not influenced by different types of diet. The surprisingly high content of bound cholesterol found in the liver—caused by cholesterol feeding—was not observed on muscle.

In the suprarenal glands of rats, the free cholesterol contents were 173.0 (basal diet), 201.0 (vitamin B deficient) and 248.0 mg per cent (control diet). In cholesterol feeding, the free cholesterol content seemed to rise to some extent, being 362.0 mg per cent;

while the high protein, fat and carbohydrate diet groups gave average values of 305.0, 321.0 and 303.0 mg per cent, respectively.

Contrary to the relatively slight influence of various diets upon free cholesterol, bound cholesterol in the suprarenal gland was markedly influenced; for instance, the vitamin B deficient diet caused a decrease in bound cholesterol. It was also decreased by feeding on a high protein diet; while feeding with cholesterol resulted in an immense increase of bound cholesterol in this gland.

From the above findings regarding the cholesterol content in various tissues, the following statement may be made:

When the cholesterol content in tissues is increased by a change in nutritional factors, for instance, by feeding on high fat or cholesterol diets, there is always an accompanying increase of bound cholesterol. Such an increase in bound cholesterol becomes more significant, as the increase of total cholesterol becomes more marked. The free cholesterol content increases, too, when the total cholesterol increases from any cause, but the range of increase in free cholesterol seems to be under a certain limit, so that an exceptionally high increase of cholesterol in the tissues is acquired at the expense of bound cholesterol.

Neutral fat—The neutral fat content was obtained by subtracting cholesterol ester fatty acids from non-phospholipid fatty acids and multiplying by the factor 1.05. The determination of neutral fat in micro procedures was hitherto accompanied by undesirable difficulties, which were greatly removed in our method (Yasuda and Ohno, 1939). The result of neutral fat determinations of various tissues under various nutritional states are expressed in Table V.

In liver, the average content of neutral fat of the vitamin B deficient diet group was 398.0 mg per cent; and those of the basal and control diet groups were 783.0 and 1030.0 mg per cent. Obviously, a vitamin B deficiency greatly decreased the neutral fat content.

By cholesterol feeding, on the other hand, liver neutral fat was increased nearly three times as much as in the other cases. The marked increase of neutral fat in liver by cholesterol feeding,

TABLE
Neutral Fat of Tissues under

Diet	Rats No.	Neutral Fat in			
		Fatty Acids Combin with Cholesterol		Non-phospholipid Fatty Acids	
		in Whole Liver	in 100 gm Liver	in Whole Liver	in 100 gm Liver
Basal Diet		mg	mg	mg	mg
	11	0.90	21.2	31.4	742.0
	12	0.87	25.2	29.7	863.0
	13	1.62	38.9	29.8	716.0
	Ave.	1.13	28.4	30.3	773.7
Vitamin-B Deficient Diet (V-B.D.D.)	23	1.22	31.7	16.4	426.0
	24	0.22	7.6	8.7	299.0
	25	0.39	17.9	9.1	421.0
	26	0.46	15.5	13.2	442.0
	Ave.	0.57	18.2	11.9	397.0
Control Diet for V-B.D.D.	31	1.73	34.2	41.8	827.0
	32	2.69	42.8	59.1	941.0
	34	1.56	21.2	76.2	1033.0
	35	2.72	40.7	84.6	1265.0
	Ave.	2.18	34.7	65.3	1016.5
High Protein Diet	43	0.83	22.3	26.1	701.0
	44	0.48	11.5	56.5	1350.0
	46	1.03	23.0	25.7	574.0
	Ave.	0.78	18.9	33.8	875.0
High Carbo- hydrate Diet	52	1.82	44.8	69.2	1699.0
	53	1.67	42.4	40.9	1038.0
	55	1.31	27.7	59.0	1247.0
	56	2.21	38.9	79.6	1399.0
	Ave.	1.75	38.5	62.2	1345.8
High Fat Diet	61	1.06	20.9	41.8	828.0
	62	0.55	9.0	86.3	1403.0
	64	0.56	11.5	68.0	1409.0
	Ave.	0.72	13.8	65.4	1213.3
Cholesterol Diet	72	85.50	1399.0	303.3	4970.0
	73	94.40	1654.0	265.3	4560.0
	Ave.	89.95	1526.5	284.3	4765.0

V.

Various Nutritional States.

Liver			Neutral Fat in Muscle			
Iodine No. of Non-phos- pholipid Fatty Acids	Neutral Fat		Fatty Acids Combined with Chole.	Non-phos- pholipid Fatty Acids	Iodine No. of Non-phos- pholipid Fatty Acids	Neutral Fat
	in Whole Liver	in 100 gm Liver	in 100 gm Muscle	in 100 gm Muscle		in 100 gm Muscle
	mg	mg	mg	mg		mg
83.4	32.1	758.0	0.1	1360.0	76.2	1353.0
85.2	32.5	880.0	6.6	730.0	71.8	760.0
93.0	29.6	711.0	1.7	1420.0	71.0	1489.0
88.9	31.4	783.0	2.8	1170.0	73.0	1200.7
115.6	16.0	414.0	12.4	577.0	102.7	593.0
116.5	8.9	306.0	3.2	157.0	105.2	161.0
98.9	9.2	424.0	0.5	184.0	101.2	192.8
113.1	13.4	448.0	0.9	274.0	110.0	286.5
111.0	11.9	398.0	4.3	298.0	104.8	308.3
120.0	42.1	832.0	4.6	1487.0	82.0	1558.0
107.0	59.2	942.0	2.5	1670.0	73.0	1750.0
112.5	78.5	1062.0	1.4	1785.0	78.6	1875.0
100.3	85.9	1284.0	3.5	1485.0	82.2	1555.0
110.0	66.4	1030.0	3.0	1607.0	79.0	1684.5
115.2	26.5	712.5	0.7	1082.0	84.3	1138.0
97.9	58.8	1405.0	2.9	1605.0	84.3	1682.0
83.5	25.9	579.0	2.1	839.0	81.0	879.0
98.9	37.1	898.8	1.9	1175.3	83.2	1233.0
93.0	70.7	1738.0	0.3	1473.0	80.9	1548.0
100.9	41.3	1048.0	0.4	1849.0	82.4	1942.0
94.0	60.6	1280.0	0.9	2213.0	85.8	2325.0
97.9	81.4	1429.0	3.2	1625.0	81.5	1702.0
96.5	63.5	1373.8	1.2	1790.0	82.7	1879.3
115.5	42.8	848.0	0.2	1580.0	73.8	1658.0
92.6	90.1	1465.0	0.7	1685.0	69.7	1770.0
100.3	70.9	1468.0	0.1	1439.0	74.5	1510.0
102.8	67.9	1260.3	0.3	1568.0	72.7	1646.0
102.3	229.0	3750.0	2.0	1440.0	80.3	1510.0
95.7	174.0	3055.0	0.9	1255.0	79.4	1318.0
99.0	201.5	3402.5	1.5	1347.5	79.9	1414.0

on which Best and others have been making elaborate studies for several years, was recognized in our experiments—regarding which the author wishes to comment later.

The neutral fat content in skeletal muscles was 1200.7 (basal diet), 308.3 (vitamin B deficient) and 1684.5 mg (vitamin B containing, control diet) per 100 gm. of moist tissue, indicating that neutral fat in muscles was decreased to a significant extent by vitamin B deficiency—as was noted in liver. The high fat diet naturally caused an increase of neutral fat in muscles, but the cholesterol diet, which caused an extensive increase of neutral fat in liver, did not show the same effect on muscles.

The iodine number of fat fatty acids was high in the case of vitamin B deficiency, otherwise nothing particular was noted concerning the iodine number of fat fatty acids.

In the suprarenal gland, the neutral fat content was found to be 12360.0 mg per cent for the basal diet group; and 4690.0 mg and 12780.0 mg per cent for the vitamin B deficient and for its control diet groups respectively. Vitamin B deficiency caused a marked decrease in neutral fat again. Cholesterol feeding did not seem to attack neutral fat in the suprarenal gland.

Changes in the iodine number of fat fatty acids in this gland was not consistent, as shown in Table VII (note: since sufficient materials were not available, only one determination was made for each sample.)

Influences upon total lipids—The sum of phospholipid, total cholesterol, neutral fat and fatty acids of bound cholesterol was expressed as total lipids. The influences of various diets on total lipids are demonstrated in Table VI, in which the following were of interest:

In liver the average content of total lipids was 4320.9 (basal diet), 3845.3 (vitamin B deficient) and 4898.1 mg per cent (control diet). By the vitamin B deficiency, the total lipids in liver were undoubtedly decreased; while an immense increase in total lipids came from feeding rats on a cholesterol diet.

In both the skeletal muscle and suprarenal gland, a similar decrease from vitamin B deficiency was observed; but an increase

TABLE VI.

Total Lipids of Tissues under Various Nutritional States.
 (Total Lipids = Phospholipid + Total Cholesterol + Fatty Acids of
 Bound Cholesterol + Neutral Fat)

Diet	Rats No.	Total Lipids of Liver		Total Lipids of Muscle
		in Whole Liver	in 100 gm Liver	in 100 gm Muscle
Basal Diet		mg	mg	mg
	11	178.94	4216.7	2343.0
	12	160.68	4598.7	1764.2
	13	172.26	4147.7	2472.3
	Ave.	170.63	4320.9	2193.2
Vitamin-B Deficient Diet (V-B.D.D.)	23	154.62	4003.2	1516.9
	24	92.61	3171.6	1399.7
	25	70.70	3271.4	1321.8
	26	117.35	3934.5	1334.2
	Ave.	108.82	3845.3	1393.2
Control Diet for V-B.D.D.	31	235.93	4665.2	2642.9
	32	299.43	4762.3	2955.1
	34	366.48	4969.2	2887.3
	35	267.77	5155.7	2596.1
	Ave.	292.40	4898.1	2770.4
High Protein Diet	43	255.63	4182.8	2193.8
	44	215.36	5147.5	2801.3
	46	199.95	4243.0	2029.5
	Ave.	223.64	4520.1	2341.5
High Fat Diet	52	225.43	5540.8	2502.2
	53	161.73	4358.4	2946.2
	55	268.09	5665.7	3635.3
	56	303.22	5329.9	2706.5
	Ave.	239.61	5223.7	2947.4
High Carbo- hydrate Diet	61	250.25	4956.4	2627.2
	62	302.67	4923.5	2892.8
	64	256.62	5311.5	2588.6
	Ave.	269.85	5065.0	2702.9
Cholesterol Diet	72	644.20	8549.0	2495.0
	73	605.30	16019.0	2432.7
	Ave.	624.75	12284.0	2463.9

TABLE VII.
Influence of Different Diets upon the Lipids of the Suprarenal
Gland of Rats.

Diet	Amount of Suprarenal Gland used for Analysis	mg	Number of Suprarenal Glands used for Analysis	Phospholipid Fraction		Cholesterol				Neutral Fat		Total Lipids
				Content	Iodine No.	Free Chole.	Bound Chole.	Total Chole.	Per Cent of Free to Total Cholesterol	Content	Iodine No.	Content
				%		%	%	%		%		%
Basal Diet	80		6	3.03	85.6	0.173	1.950	2.123	8.2	12.360	63.2	18.918
Vitamin-B. Deficient Diet	91		8	4.20	105.0	0.201	0.924	1.125	17.9	4.690	58.0	10.680
Diet for V-B.D.D.	128		8	3.49	91.6	0.248	1.690	1.938	12.8	12.780	83.5	19.424
High Protein Diet	88		6	3.64	88.0	0.305	3.445	3.750	8.2	2.625	91.4	12.495
High Fat Diet	94		8	2.97	100.8	0.321	4.770	5.091	6.3	1.810	62.7	13.306
High Carbo- hydrate Diet	89		6	3.42	84.3	0.303	4.680	4.983	6.1	1.639	80.3	13.412
Cholesterol Diet	69		4	4.23	96.4	0.362	6.330	6.692	5.4	1.355	67.5	16.837

of total lipids from cholesterol feeding did not occur in muscles. The total lipids in the suprarenal gland were increased by cholesterol feeding to a considerable extent, due to an increase in bound cholesterol.

COMMENTS.

In comparing the above data with those reported by previous workers, the following may be noteworthy:

The proportion of liver weight to body weight was between 3.5 and 4.0 per cent. Nakamura (1936) reported that the weight of the liver of rats weighing 52–100 gm. was 4.7–5.6 per cent of body weight; and Deuel (1937) found that the liver of rats weighing 155 gm. and 200 gm. occupied 4.93 and 4.25 per cent of the body weight respectively. These values agreed with the one obtained by the present author.

The glycogen content of the liver of non-fasting rats was 1.05 per cent after Britton and Silvette (1932). Drill (1937) reported that the glycogen value of rats fasting 24 hours was 2.65 per cent; while Deuel (1937) stated that the liver glycogen content of male rats weighing about 200 gm. was 4.25 per cent, and the value for older rats weighing 235 gm. was 4.34 per cent. Our results on the liver glycogen of non-fasting rats were found to be from 2.83 to 4.17 per cent, or 3.53 per cent on the average, where glycogen content was expressed in terms of glucose.

Regarding the phospholipid content of the liver of normal albino rats, Aoki has reported in his recent work (1938) that the values were between 2.91 and 3.45 per cent (average, 3.16 per cent) which agreed fairly well with the values in this report (3.53 to 3.65; average, 3.58 per cent). His values for muscle phospholipid were between 1.10 and 1.17 (average, 1.14) per cent, which likewise agreed with the ones obtained by the writer (0.946–1.110, average 1.006%).

The free and bound cholesterol contents of the liver were 184–266 (average 215) mg. per cent, and 20–53 (average 38) mg. per cent respectively—after Iki (1938). Aoki (1938) found that the free cholesterol content was between 208–242 mg per cent and that

the average content of bound cholesterol was 77 mg per cent. The above two authors determined cholesterol by the Digitonin Colorimetric Method of Yasuda (1936), which having been adopted in the present work, gave the values 181.5–206.5 for free cholesterol, and 29.5–59.5 mg. per cent for bound cholesterol.

In muscle, the free cholesterol was reported by Aoki (1938) to be 0.031–0.057, averaging 0.046 per cent, which is slightly lower than the values of the writer (0.059–0.089 per cent). The total cholesterol content in muscle given by Aoki was 0.068 per cent which is near the value (0.075 per cent) obtained by the writer.

The influence of vitamin B upon the glycogen content of tissues has been a question of much interest to many workers. In 1931, Collazo and Bayo claimed that liver glycogen was decreased by vitamin B deficiency, and the work of Sure and Smith (1932) gave the same conclusion. However, Abderhalden and Wertheimer (1932) recognized that glycogen in pigeon liver was increased by vitamin B deficiency, and Duffau (1937) reported that muscle glycogen was increased thereby. Nagamochi (1937) was inclined to think that glycogen content was decreased by vitamin B deficiency. On the other hand, according to Westenbrink (1933), glycogen formation in the liver remained unchanged. The results presented in this communication, somewhat different from either of the above investigators, showed that the average content of glycogen in liver was apparently lowered by vitamin B deficiency. However, the percentage values of glycogen varied from each other to a considerable extent so that there were cases in which glycogen values did increase over the values of the control experiment. The liver weight of rats, proportional to the decrease in body weight, was greatly decreased by vitamin B deficiency. The absolute amount of liver glycogen, therefore, was undoubtedly lowered by B deficiency, or at any rate, the data of this communication suggest that vitamin B deficiency does not increase the glycogen content of tissues. Concerning the glycogen of tissues other than liver, the author could not demonstrate any definite change due to vitamin B deficiency. Duffau found an increase of glycogen in skeletal muscle, while Nagamochi claimed a decrease in muscle

glycogen from vitamin B deficiency. The influence of this vitamin upon tissue glycogen other than liver does not seem consistent, nor of importance.

The lipid analysis of tissues in the case of vitamin B deficiency showed that: 1) in liver, both the percentage value and the absolute amount of all fractions of lipids decreased; 2) in skeletal muscles, a decrease in neutral fat content was observed, while the per cent of free cholesterol increased; 3) in the suprarenal gland, decreases in bound cholesterol and neutral fats contents were remarkable.

Thus, a vitamin B deficiency appeared to affect both glycogen and lipids in tissues and the changes in glycogen content, whether increase or decrease, paralleled to those of the lipids content. Striking influences on lipids were seen in the liver and suprarenal gland.

Mirski (1938) has lately worked on the effect of high carbohydrate and high protein diets upon the liver and muscle glycogen of rats. He pointed out that a high protein diet retarded the growth of male albino rats, and that glycogen in the liver was significantly lower than in the case of a high carbohydrate diet; i.e., the glycogen content of the liver was about 4 per cent when rats were fed on a high carbohydrate diet, whereas the value was 1.4 per cent when they were fed on a high protein diet. The change in muscle glycogen was slight. These data mostly agree with those in this communication.

According to Miyasaki (1936), a high fat diet caused an increase in total lipids of the liver, accompanied by a decrease in the glycogen content. When the carbohydrate in the diet was increased in the above case, the decrease of glycogen was minimized. The writer has recognized that a high fat diet increases the free and bound cholesterol together with the neutral fat contents in the liver—the total lipids contents being consequently increased. The decrease of glycogen, which Miyasaki reported in this case, was not observed. The appearance of fatty liver from the addition of cholesterol to the diet has been intensively studied by Best, Channon et al. (1934–38). The accumulation of fat in liver, which has been reported as characterizing the effect of a high

cholesterol diet, was observed by the writer. However, the increase in cholesterol—particularly in the bound cholesterol content—was more striking than the increase of neutral fat in liver. This was especially true in the suprarenal gland, in which largely increased cholesterol existed in the form of ester. In liver, nearly one-third of the total non-phospholipid fatty acids were combined with cholesterol.

From these results, it can be assumed that, when cholesterol increases in any tissue much beyond the normal range, it may be combined with fatty acids and stored as such. The high melting point of free cholesterol is greatly lowered by the formation of ester, in which form cholesterol would escape from the risk of being deposited, and would safely be stored in animal tissues. The influence of a high cholesterol diet upon muscle lipids was again negligible, as was repeatedly observed in cases of feeding experiments with various other diets.

SUMMARY AND CONCLUSIONS.

For convenience's sake, the results of the foregoing experiments demonstrated in Table II–VI are abstracted in Table VIII.

It may be clear that the influence of vitamin B deficiency upon the glycogen and lipids contents of the tissues is that of a considerable decrease of these substances in liver. In muscles, the glycogen content appears unaffected. Of lipids, the free cholesterol in muscles increases to some extent, while the neutral fat decreases and the total lipids content in muscles is also decreased.

The influences of an exceptional increase of one of three major food stuffs are briefly stated as follows: a high protein diet causes a decrease in glycogen and neutral fat in liver, while, in skeletal muscles, such changes are negligible. By feeding with a high fat diet, the definite increase of neutral fat, together with both free and bound cholesterol, is striking. Fat and total lipids in muscles are also increased thereby, though not significantly. The suprarenal gland is, likewise, little influenced. A high carbohydrate diet results in a slight increase of glycogen and fat, or total lipids, in

TABLE VIII.
Summary of Glycogen and Lipids Analysis of Rat Tissues under
Various Nutritional States.

Various Nutritional States.

Tissue	Diet	Glycogen Content (In terms of glucose)	Lipids							
			Phospholipid Fraction		Cholesterol Content			Neutral Fat		Total Lipid Content
			Content	Iodine No.	Free Chole.	Total Chole.	Per Cent of Free to Total Chole.	Content	Iodine No.	
Liver	Basal Diet	% 3.970	% 3.31	101.0	% 0.157	% 0.196	80.2	% 0.783	88.9	% 4.321
	Vitamin-B. Deficient Diet	2.306	2.98	107.0	0.174	0.199	87.6	0.398	111.0	3.845
	Control Diet for V.B.D.D.	3.528	3.58	111.4	0.195	0.243	80.3	1.030	110.0	4.898
	High Protein Diet	1.731	3.40	96.9	0.184	0.210	87.4	0.899	98.9	4.520
	High Fat Diet	2.302	3.54	102.1	0.213	0.267	80.1	1.374	96.5	5.224
	High Carbohydrate Diet	4.002	3.59	104.0	0.181	0.200	90.7	1.260	102.8	5.065
Skeletal Muscle	Cholesterol Diet	4.175	3.26	102.3	0.279	2.400	11.7	3.403	99.0	12.284
	Basal Diet	0.739	0.92	101.7	0.063	0.066	94.4	1.201	73.0	2.193
	V.B.D.D.	0.510	0.97	105.0	0.107	0.113	94.4	0.308	104.8	1.393
	Control Diet for V.B.D.D.	0.569	1.01	113.2	0.071	0.075	94.5	1.685	79.0	2.770
	High Protein Diet	0.522	1.03	117.2	0.077	0.080	96.8	1.233	83.2	2.342
	High Fat Diet	0.527	0.98	100.0	0.083	0.085	98.2	1.879	82.7	2.947
Skeletal Muscle	High Carbohydrate Diet	0.637	0.99	108.3	0.069	0.070	99.4	1.616	72.7	2.703
	Cholesterol Diet	0.590	0.96	92.9	0.086	0.088	97.7	1.414	79.9	2.464

both the liver and skeletal muscles. No appreciable change in the above substances is seen in the suprarenal gland.

A cholesterol diet or cholesterol feeding does not seem to affect glycogen, but its influence on lipids contents is characterized by a definite increase of neutral fat and bound cholesterol, by less significant increases of free cholesterol and by almost no change in phospholipid.

In this case, the content of bound cholesterol in liver reaches 8 times as much as the free cholesterol, and about one-third of the total non-phospholipid fatty acids is combined with cholesterol as esters. In skeletal muscles, however, no particular changes in various lipids fractions is observable. Attention is called to the lipids contents in the suprarenal gland in the case of cholesterol feeding, as is shown in Table VII, whereby a significant increase in bound cholesterol is marked, while phospholipid, free cholesterol and neutral fat remain almost unaffected.

Throughout all the feeding experiments, the glycogen content in heart muscle and brain were influenced to the least extent.

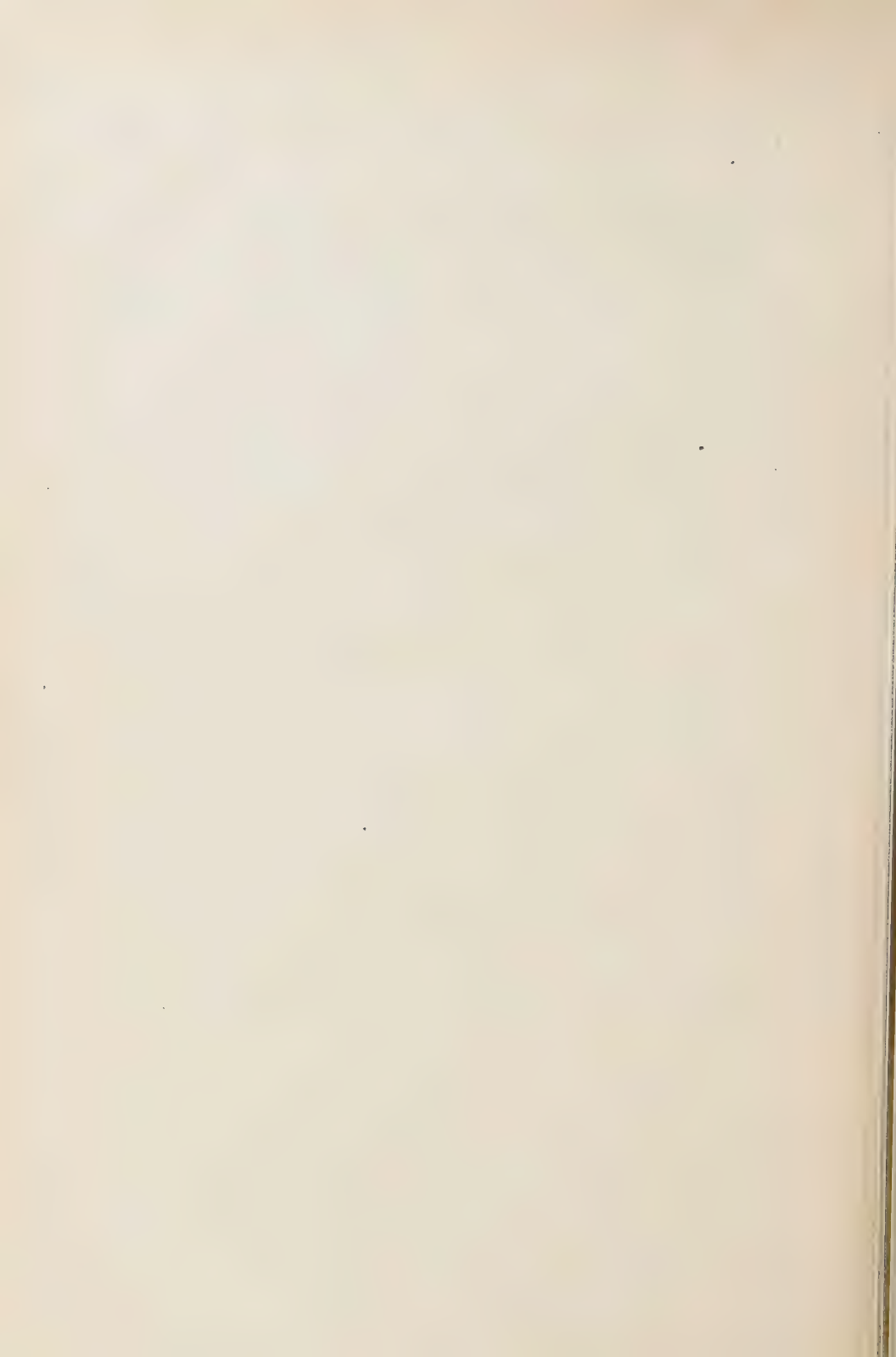
Of lipids fractions, the phospholipid content in tissues was strikingly consistent under various nutritional states, despite the fact that the neutral fat and cholesterol were greatly dependent upon the nature of the diet given the animals. The analysis of cholesterol in liver and the suprarenal gland appeared to call particular attention to the fact that the increase of cholesterol in tissues, by whatever means it may be caused, is brought forth by the increase of cholesterol in esterified form.

The author wishes to thank Dr. Morio Yasuda, chief of the Biochemistry Department of this Institute, for his helpful criticisms throughout the course of this work.

BIBLIOGRAPHY.

- Abderhalden, E. and Wertheimer, E. (1932): *Arch. Ges. Physiol.*, **230**, 601.
Aoki, C. (1938): *Japanese J. Cancer Research (Gan)*, **32**, 100.
Best, C. B., Channon, H. J. et al. (1934-38): *J. Physiol.*, **81**, 409; **84**, 38; *Biochem. J.*, **32**, 969, 976, 1332.
Britton, S. W. and Silvette, H. (1932): *Am. J. Physiol.*, **100**, 693.

- Collazo, J. A. and Bayo, C. P. (1931): *Biochem. Zeits.*, **238**, 335.
Deuel, H. J., et al. (1937): *J. Biol. Chem.*, **119**, 617.
Drill, V. A. (1937): *J. Nutrition*, **14**, 355.
Duffau, R. (1937): *C. R. Acad.*, **204**, 192.
Good, C. H., Kramer, H., M. Somogi (1933): *J. Biol. Chem.*, **100**, 485.
Iki, H., et al. (1938): *Mitteilungen d. Med. Gesellschaft zu Osaka*, **37**, 1045.
Mirski, A., et al. (1938): *J. Physiol.*, **92**, 48.
Miyasaki, M. (1936): *J. Biochem.*, **24**, 408.
Nagamochi, M. (1937): *Tokyo Igk. Z.*, **51**, 25.
Nakamura, K., et al. (1936): *Tokyo Igk. Z.*, (*Mitteilungen d. Med. Gesellschaft zu Tokyo*), **50**, 1479.
Sure, B. and Smith, M. (1932): *Arch. Int. Med.*, **49**, 397.
Westenbrink, H. G. K. (1933): *Arch. Néerland. Physiol.*, **18**, 429.
Yasuda, M. (1936): *J. Biochem.*, **24**, 429.
Yasuda, M. and Ohno, K. (1939): *J. Biochem.*, under press.



ÜBER DAS SCHICKSAL DER 3,6-DIKETOALLO- CHOLANSÄURE UND DER β -3-OXY-6-KETOALLO- CHOLANSÄURE IM KRÖTENORGANISMUS.

VON

MORIHISA TUKAMOTO.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 11. Juli 1939)

In der vorigen Mitteilung (Tukamoto 1939) wurde bereits berichtet, dass die 3,6-Diketocholelansäure im Krötenorganismus sowie die α -3-Oxy-6-ketocholelansäure im Kaninchenkörper unter sterischer Umlagerung der Cholelansäure in Allocholelansäure und unter Epimerisierung der sekundären Alkoholgruppe in der Stellung am C₃ des Gallensäuremoleküls in β -3-Oxy-6-ketoallocholelansäure verwandelt im Harn ausgeschieden wird, deren HO-Gruppe der sog. β -Konfiguration des Sterins und deren Ringe A u. B der trans-Dekalinform, dem Cholestanol angehören. Dabei habe ich die Bemerkung gemacht, dass im Organismus auch eine umgekehrte Umlagerung auftreten muss.

In diesem Sinne habe ich in vorliegendem Versuch das Schicksal der β -3-Oxy-6-ketoallocholelansäure sowie das der 3,6-Diketoallocholelansäure im Organismus von Kröten untersucht, um zu sehen, ob wirklich sterische Umlagerung der beiden Säuren stattfinden kann und ob die 3,6-Diketoallocholelansäure auch im Krötenorganismus unter Reduktion in β -3,6-Dioxyallocholelansäure verwandelt wird, wie Miyazi (1938) beim Versuch mit dem Kaninchenorganismus beobachtet hat.

Bei subkutaner Zufuhr von 3,6-Diketoallocholelansäure (insgesamt 15,6 g) wurden aus dem Harn (1,1 Liter) von Kröten 0,25 g β -3-Oxy-6-ketoallocholelansäure und aus der Galle (110 Gallenblasen) 0,1 g unveränderte 3,6-Diketoallocholelansäure gefunden, wobei leider keine andere Gallensäuren, weder aus dem Harn noch aus der Galle, krystallinisch erhalten werden konnten.

Bei Zufuhr von β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure (insgesamt 9,8 g) wurden aus dem Harn von Kröten (2,6 Liter) nur 0,12 g unveränderte β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure und aus der Galle (70 Gallenblasen) nur eine minimale Menge derselben kristallinisch erhalten.

Daher wurde im Krötenorganismus keine Umlagerung der Allocholansäurereihe in Cholansäurereihe und keine Umwandlung der trans-Dekalinform in die cis-Dekalinform des Gallensäuremoleküls beobachtet.

Durch diesen Versuch lässt sich jedoch nicht ausschliessen, dass eine solche Umlagerung im Organismus unter keinen Umständen stattfinden kann, da die erhaltene Menge der Säuren aus Harn und Galle im Vergleich mit derjenigen der zugeführten Gallensäuren sehr gering ist, von denen ein Teil in normale Gallensäuren verwandelt und im Organismus ausgenutzt worden sein muss.

Der Unterschied in den Tatsachen, dass die zugeführte 3,6-Diketoallocholansäure im Krötenorganismus in β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure, im Kaninchenorganismus aber in β -3- α -6-Dioxyallocholansäure verwandelt wird, beruht höchstwahrscheinlich auf der Verschiedenheit der Versuchstiere und der Versuchsbedingungen.

Man ist wohl zu den Annahme berechtigt, dass die β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure als eine körperfremde Substanz zu betrachten ist und dass sie demzufolge unverändert zum Teil im Harn ausgeschieden wird. Weiter ist hier zu bemerken, dass bei Zufuhr von β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure die Gallenblase prall und elastisch in Bohnen- oder Daumenkopfgrosse angefüllt ist und dass dabei die Harnmenge im Vergleich mit der der Kontrolltiere ziemlich vermehrt ist, während bei Zufuhr von 3,6-Diketoallocholansäure die Menge von Galle und Harn nicht merklich erhöht ist. Es scheint also β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure im Organismus choleretisch und diuretisch zu wirken.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

I. Bei Zufuhr von 3,6-Diketoallocholansäure.

Den Kröten wurden ca. 2 ccm einer 1%igen 3,6-Diketoallo-

cholanatlösung per Tier täglich einmal subkutan verabreicht, am nächsten Tag ihr Harn durch Katheterisierung gesammelt und bald danach wieder die Gallensäurelösung injiziert. Diese Behandlung wurde in gleicher Weise wiederholt. Andererseits wurden die so behandelten 3–4 oder 7–8 Kröten täglich nach der Katheterisierung getötet, um ihre Gallenblasen herauszunehmen. Der katheterisierte Harn wurde sofort mittels des elektrischen Föhns in der Wärme zum Trocknen abgedampft. Die gesammelte Galle wurde in Alkohol aufbewahrt.

Der Versuch wurde von Ende Februar bis Anfang März 17 Tage lang ausgeführt. Zum Versuch wurden 110 Kröten verwendet, Injektion bzw. Katheterisierung erfolgte 780 mal, die exstirpierten Gallenblasen betrugen 110, der gesammelte Harn ergab 1,1 Liter von spec. Gewicht 1010 und die einverleibte Gallensäuremenge betrug insgesamt 15,6 g.

1. β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure aus Harn.

Der getrocknete Harnrückstand wurde mit absolutem Alkohol erschöpfend extrahiert, der Alkoholauszug auf dem Wasserbade eingengt, mit der doppelten Menge Wasser verdünnt und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mittels Petroläthers zweimal wiederholt geschüttelt.

Diese Wasser-Alkoholschicht wurde mit einer 5%igen Natriumcarbonatlösung schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade der Alkohol und Petroläther abgedampft und eingengt, wobei sich auf dem Boden des Gefäßes eine mässige Menge von Krystallen abschied. Die abfiltrierten Krystalle wurden in einer kleinen Menge Wasser gelöst und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Essigäther ausgeschüttelt. Dieser Essigätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser und dann nach dem Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat auf dem Wasserbade eingengt, wobei sich glänzende Krystalle abschieden. Die abfiltrierten Krystalle wurden mehrmals aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Ausbeute 0,25 g. Prismen vom Schmelzpunkt 247° . Sie zeigen mit reiner β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure keine Schmelzpunktdepression.

4,080, 3,885 mg Subst.: 10,985, 10,430 mg CO₂, 3,540, 3,310 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ber.	C 73,78	H 9,81
	Gef.	„ 73,52, 73,49	„ 9,81, 9,53.

Aus dem von diesen Krystallen abgetrennten Filtrat wurde keine Fällung mehr gewonnen.

2. 3-6-Diketoallocholansäure aus Blasengalle.

Die in Alkohol aufbewahrte Galle wurde vom Mucin abfiltriert, durch Abdampfen vom Alkohol befreit und mit Äther zweimal ausgeäthert, wodurch sie in einen Ätherauszug (A) und eine wässrige Schicht (B) getrennt wurde.

Wässrige Lösung (B): die Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Essigäther ausgeschüttelt, der Essigätherauszug nach dem Waschen mit Wasser und nach dem Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat eingeengt, wobei sich eine teilweise krystallisierte ölige Masse abschied. Diese Masse wurde durch Zusatz von Essigäther wieder gelöst.

Der Essigätherauszug wurde mit einer 5%igen Sodalösung ausgeschüttelt, die Sodalösung nach dem Einengen abgekühlt, wobei sich eine ziemlich reichliche Krystallmasse absetzte, und filtriert. Die Krystallmasse wurde in Wasser suspendiert und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert.

Da kein Krystall beim Verdunsten aus dem Ätherauszug auftrat, so wurde der Ätherauszug zum Trocknen abgedampft, getrocknet und in Petroläther einige Male digeriert. Der Rückstand wurde in Äther digeriert und in je eine ätherlösliche und ätherunlösliche Hälfte geteilt. Ätherlöslicher Teil: beim Verdunsten dieser Lösung wurde ein Krystall erhalten, der zuerst aus Essigäther, dann aus Aceton mehrmals umkrystallisiert wurde. Ausbeute 0,1 g. Schuppen vom Schmelzpunkt 209–210°. Keine Schmelzpunktdepression mit 3,6-Diketoallocholansäure.

3,645, 3,420 mg Subst.: 9,370, 9,260 mg CO₂, 2,960, 2,795 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₆ O ₄	Ber.	C 74,19	H 9,34
	Gef.	„ 74,00, 73,90	„ 9,14, 9,09.

Aus dem ätherunlöslichen Teil wurde kein einheitlicher Krystall gewonnen, obwohl er aus Essigäther oder Aceton mehrmals umkrystallisiert wurde.

Der Ätherauszug (A): beim Verdunsten wurde niemals ein Krystall sondern nur eine ölige kolloidale Masse erhalten. Somit wurde die Ätherlösung in Sodalösung aufgenommen, diese Sodalösung eingeengt, wobei Natriumsalz auskrystallisierte. Dieses Natriumsalz wurde in Wasser mit verdünnter Salzsäure mit Äther ausgeäthert. Aus diesem Ätherauszug wurde kein Krystall gewonnen. Daher wurde der Rückstand getrocknet, pulverisiert, in Petroläther einige Male digeriert und durch Digerieren in Äther in ein ätherlösliche und in eine ätherunlösliche Hälfte geteilt. Aus beiden Hälften wurde leider kein krystallisierter Körper erhalten.

II. Bei Zufuhr von β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure.

In genau gleicher Weise wie vorher wurde den Kröten ca. 2 ccm einer 1%igen β -3-Oxy-6-ketoallocholanatlösung subkutan verabfolgt. Dieses Gallensäuresalz ist in Wasser schwer löslich. So wurde die Gallensäure in 90%igem Alkohol im Verhältnis 1:10–13 gelöst, mit berechneter Menge von n -NaOH-lösung und weiter mit einer 0,6%igen Kochsalzlösung versetzt, bis die Lösung ein Prozent der Gallensäure enthalten konnte.

Der Harn und die Galle wurden in genau gleicher Weise wie vorher gesammelt. Der Versuch wurde von Ende April bis Anfang Mai 11 Tage lang ausgeführt. Die Zahl der zum Versuch verwendeten Kröten betrug insgesamt 70, Injektion bezw. Katheterisierung erfolgte 490 mal, die gesammelte Harnmenge ergab 2,6 Liter vom spez. Gewicht 1005, herausgenommen wurden 70 Gallenblasen und eingeführt wurde eine Gallensäuremenge von insgesamt 9,8 g.

1. Harnbefund.

Der Rückstand wurde genau wie vorher behandelt. Die Säure wurde in Sodalösung aufgenommen, das dabei erhaltene, in Wasser schwerlösliche Salz unter Ansäuren in Essigäther, dann nach dem Digerieren mit Petroläther in Äther wieder aufgenommen. Aus der ätherlöslichen Fraktion, nicht aber aus der ätherunlöslichen, wurde eine Krystallmasse erhalten, die aus Essigäther und Aceton-Wasser mehrmals umkrystallisiert wurde. Prismen vom Schmelz-

punkt 247°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure. Ausbeute 0,12 g.

3,510, 3,550 mg Subst.: 9,450, 9,590 mg CO₂ 3,080, 3,090 mg H₂O.

H₂₄H₃₆O₄ Ber. C 73,79 H 9,81

Gef. „ 73,48, 73,67 „ 9,74, 9,82.

Das von dem in Wasser schwerlöslichen Salz abgetrennte Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die Fällung in Äther aufgenommen und die in Äther unlösliche Masse in Ammoniaklösung gelöst und wieder unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther extrahiert.

Die beiden Ätherauszüge wurde vereinigt und in Zimmertemperatur stehen gelassen. Der dabei abgeschiedene Krystall wurde aus Essigäther und aus Aceton-Wasser mehrmals umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 247°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure.

2. Gallenbefund.

Aus der von Mucin befreiten Galle wurde genau wie vorher der Ätherauszug (A) und die wässrige Lösung (B) gewonnen.

Obwohl der Ätherauszug (A) über Natriumsalz regeneriert wurde wie vorher, wurde doch kein Krystall daraus gewonnen. Somit wurde der Rückstand in Essigäther wieder in Sodalösung aufgenommen, das beim Einengen abgeschiedene Natriumsalz unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure wieder in Äther aufgenommen. Der aus diesem Ätherauszug erhaltene Rückstand konnte nicht in Krystallform gebracht werden, obwohl er aus Essigäther oder aus Aceton umkrystallisiert wurde.

Die wässrige Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure in Essigäther, dann in Sodalösung aufgenommen, das beim Einengen der Sodalösung erhaltene Natriumsalz unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert. Aus diesem Ätherauszug wurde kein Krystall gewonnen.

Diese Behandlung wurde nochmals wiederholt. Aus dem letzten Ätherauszug wurde eine minimale Menge von Krystallen an der Wand des Gefäßes erhalten, die aus Aceton-Wasser in Prismen krystallisierten. Sie zeigten mit der aus dem Harn er-

haltenen β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure keine Schmelzpunktdepression.

LITERATUR.

Miyazi, S. (1938): Z. Physiol. Chem., **254**, 104.

Tukamoto, M. (1939): Ebenda **260**, 210.

ÜBER DIE KOLORIMETRISCHE MIKROBESTIMMUNG DES FORMALDEHYDS.

VON

DANJI MATSUKAWA,

*(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts
in Tokio. Direktor: Dr. Akiji Fujita.)*

(Eingegangen am 13. Juni 1939)

Ich (1939 1) habe schon eine genaue Mikrobestimmungsmethode des Formaldehyds beschrieben, die darin besteht, dass man Aldehyd mittels Dimedon fällt, wie Velluz (1932) und Wadsworth (1936), und das entstandene Aldomedon nicht gewichtsanalytisch, sondern oxydimetrisch bestimmt wird, wie bei der Lipoid-bestimmung von Bloor (1928) und Nieloux (1927). Diese Methode ist zur Bestimmung von mehr als 0.1 mg Formaldehyd geeignet. Da die Bindung zwischen Formaldehyd und Dimedon sehr fest und undissozierbar ist, wird das reversibel gebundene Formaldehyd, wie es bei der Formoltitration der Aminosäure der Fall ist, durch Dimedon von der lockeren Bindung losgerissen und ausgeschieden. Um den Chemismus der Toxoidbildung aus Bakterientoxinen zu untersuchen, ist es daher wichtig, das Formaldehyd auch nach dem anderen Princip zu bestimmen und die Werte mit denen mittels Dimedon zu vergleichen. Ich habe dazu eine genaue kolorimetrische Bestimmungsmethode ausgearbeitet, die im folgenden beschrieben werden soll.

Bisher wurde die kolorimetrische Bestimmung des Formaldehyds vielfach versucht, so z. B. durch Resorcinreaktion nach Zhitkova (1936), Phloroglucinreaktion nach Collins (1916), Phenylhydrazinreaktion nach Schryver (1920) und Hyman (1930), fuchsin-schweifige Säurereaktion nach Fricker (1937). Die entstandene Farbe all dieser Reaktionen sind aber sehr unbeständig. Sie können zwar zur qualitativen Bestimmung angewandt werden, aber keine ist zur genauen quantitativen Bestimmung geeignet. Die hier zu beschreibende Methode ist wohl auf

der Phenylhydrazinreaktion begründet, aber sie ist soweit verbessert, dass die entstandene Farbe praktisch beständig genug, reproduzierbar, äusserst empfindlich (man kann bis zu 0.4% Formaldehyd genau bestimmen) und für Formaldehyd bedeutend spezifisch ist. Nach Beschreibung der Methode werden die Ergebnisse der Bestimmung des freien Formaldehyds in roher Diphtherietoxinlösung während der Toxoidumwandlung berichtet.

I. KOLORIMETRISCHE BESTIMMUNG DES FORMALDEHYDS.

Reagenzien.

1. 8%ige NaCl-Lösung.
2. 0.5%ige Phenylhydrazinhydrochloridlösung in 50 Vol.-%igem Äthylalkohol.

Käufliches Präparat von Phenylhydrazin-HCl (Takeda) ist bräunlich gefärbt. Es soll folgendermassen gereinigt werden: In einen Kolben mit 1 ccm destilliertem Wasser und etwa 50 ccm absolutem Alkohol werden etwa 2 g Phenylhydrazin-HCl gebracht, durch Erwärmen¹⁾ im Wasserbad gelöst und sofort filtriert. Das Filtrat wird unter Schütteln im Eiswasser abgekühlt. Reichliche schuppenartige Krystalle scheiden ab, die abgenutscht werden. Die Krystallmasse wird mit eisgekühltem absoluten Alkohol gewaschen, bis die braunen Farbstoffe vollkommen beseitigt werden. Die Krystalle werden im Exsikkator über KOH getrocknet und in gut verschlossener Flasche im Dunkeln aufbewahrt. 50 mg dieser gereinigten Krystalle werden in 5.0 ccm Wasser aufgelöst und mit 5.0 ccm absolutem Alkohol gut gemischt. Diese Lösung wird einmal täglich frisch hergestellt und in Eiswasser gelegt.²⁾

3. 2.5%ige Kaliumferricyanidlösung in 40 Vol.-%igem Äthylalkohol.

1) Langes Erhitzen muss vermieden werden.

2) Beim Stehen bei Zimmertemperatur färbt sich die Lösung nach 6 Stunden etwas gelblich und nach 24 Stunden ziemlich deutlich gelb, während sie im Eisschrank selbst nach 24 Stunden farblos bleibt. Durch Gegenwart des Alkohols in der Phenylhydrazinlösung entsteht keine Trübung nach Ferricyanid-Zusatz.

2,5 g K-ferricyanid (pro analysi) wird in 50 ccm Wasser gelöst, 40 ccm absoluter Alkohol zugesetzt. Nach dem Mischen und Abkühlen wird das Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.¹⁾ Man bewahrt es in brauner Flasche auf. Bei Zimmertemperatur bleibt es lange haltbar.²⁾

4. Salzsäurelösung.

Konzentrierte Salzsäure (pro analysi, Sp. G. 1,19, mit ca. 37% HCl) wird mit Wasser aufs doppelte verdünnt.

5. Absoluter Äthylalkohol.

Man destilliert einmal den käuflichen absoluten Alkohol mit glasgeschliffenem Apparat.

Ausführung.

Zu 2,0 ccm der zu untersuchenden Lösung mit 0,02 bis 1,0 mg-%igem Formaldehyd (optimal 0,1 bis 0,2 mg%) werden 1,0 ccm 8%iges NaCl und 1,0 ccm Phenylhydrazinlösung zugesetzt. Nach gutem Mischen wird sie 5 bis 10 Minuten lang ins Wasserbad von 40°C gebracht.³⁾ Dann fügt man 0,5 ccm Ferricyanidlösung hinzu. Nach dem Mischen setzt man *sofort* 0,75 ccm Salzsäurelösung zu und mischt wieder gründlich durch. Es wird 10 Minuten lang in ein Wasserbad von 15°C gelegt. Die Lösung wird je nach dem Gehalt des Formaldehyds mehr oder weniger schön rot mit einem Stich ins Violett. In 5 mm-Küvette⁴⁾ wird mit Pulfrich-Photometer (Filter S 53) die Extinktion gemessen. Als Blindversuch verwendet man Wasser statt der zu bestimmenden Lösung. Die Berechnung geschieht nach folgender Formel:

$$X = 0,530 \cdot (E - E_0) \cdot v \text{ [mg \% Formaldehyd]}$$

1) Durch Gegenwart des Alkohols in der Ferricyanidlösung tritt keine Trübung nach Zusatz der Reagenzien auf. Ausserdem hemmt der Alkohol die Entstehung von Schimmelpilzen in der Ferricyanid-Lösung.

2) Nach einem Jahr langem Liegen im Zimmer war die Extinktion der entstandenen Färbung mit den Reagenzien etwa 15% niedriger.

3) Man darf nicht länger als 20 Minuten erwärmen. Dann färbt sich auch die Blindprobe.

4) Vor Photometrierung wird die Küvette am besten vorher im Wasserbad von 15°C erwärmt.

wobei E die Extinktion des Hauptversuches, E_0 die des Blindversuches, v die Verdünnung bedeutet. E_0 ist gewöhnlich 0. Die Versuchsfehler betragen gewöhnlich $\pm 2\%$.¹⁾

EXPERIMENTELLES.

1. Einfluss der Wirkungsdauer des Phenylhydrazins und der Temperatur.

Zu 2,0 cem 0,093 mg%iger HCHO-Lösung werden NaCl- und Phenylhydrazinlösung vorschriftsmässig zugesetzt und die Gefässe im Wasserbad von 20 bis 50°C verschieden lange eingebracht. Danach fügt man vorschriftsmässig Ferricyanid- und HCl-Lösung hinzu, bringt dies 10 Minuten in ein Wasserbad von 20°C und photometriert. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 wiedergegeben. Man sieht daraus, dass die Extinktion der Farblösung nach der Wirkung des Phenylhydrazins bei 40°C am beständigsten ist.

2. Einfluss der Temperatur bei der Wirkung des Ferricyanids.

2,0 cem 0,1 mg%ige HCHO-Lösung werden vorschriftsmässig behandelt. Nach Zusatz der sämtlichen Reagenzien werden die Gefässe 10 Minuten lang ins Wasserbad von verschiedenen Temperaturen gelegt und photometriert. Wie aus Abb. 2 ersichtlich ist, werden die Extinktionen oberhalb 20°C deutlich kleiner. Ich habe daher in die Vorschrift bequemilichkeitshalber ein Erwärmen auf 15°C aufgenommen.

Abb. 1.

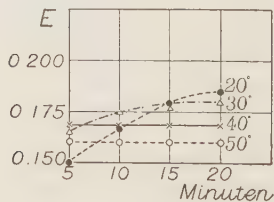
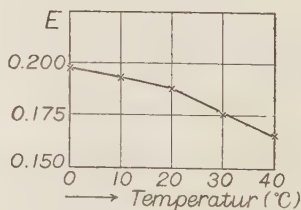


Abb. 2.



3. Einfluss der Dauer zwischen Zusatz des Ferricyanids und der Salzsäure.

1) Phenol hat in den praktisch in Betracht kommenden Konzentrationen keinen Einfluss auf Extinktion.

2,0 ccm 0,1 mg%ige HCHO-Lösung werden vorschriftsmässig behandelt, nur mit dem Unterschiede, dass man nach Zusatz des Ferrieyanids entweder sofort, nach 5 Minuten oder nach 10 Minuten Salzsäurelösung hinzugefügt. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, muss die Salzsäure sofort zugesetzt werden.

4. Einfluss der Menge der zugesetzten NaCl-Lösung.

Zu 2,0 ccm 0,09 mg%iger HCHO-Lösung wird 1,0 ccm verschieden konzentrierter NaCl-Lösung und Phenylhydrazinlösung zugesetzt, ins Wasserbad von 40°C verschieden lange gebracht und vorschriftsmässig behandelt. Wie Abb. 4 zeigt, sind die Konzentrationen der NaCl-Lösung zwischen 7 bis 10% belanglos und die entstandene Farbe beständig. Darüber hinaus werden die Extinktionen unbeständiger. Nebenbei sei erwähnt, dass die Extinktionen ohne Zusatz der NaCl-Lösung je nach der Mischungsweise des Ferrieyanids variabel sind, während diese Unbequemlichkeit nach Zusatz von NaCl verschwindet.

Abb. 3.

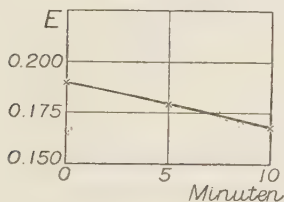
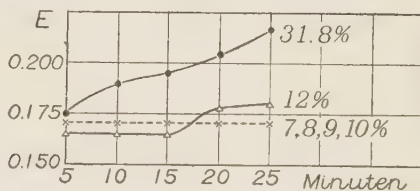


Abb. 4.



5. Absorptionsspektrum der gefärbten Lösung.

2,0 ccm 0,392 mg%ige HCHO-Lösung werden vorschriftsmässig behandelt. Von dieser Lösung werden die Extinktionen mit verschiedenen Filtern gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt. Wir haben deshalb als geeignetesten Filter S 53 benutzt.

6. Extinktion und Formaldehydkonzentration.

Verschieden konzentrierte Formaldehydlösungen¹⁾ werden vorschriftsmässig behandelt. Die gemessenen Extinktionen sind in

1) Verdünnte HCHO-Lösung ist ziemlich unbeständig. So fand ich 10 mg%ige Lösung 2 bis 3 Tage nach Herstellung konstant, aber nach 11 Tagen etwa 13% weniger.

Abb. 6 wiedergegeben. Man sieht daraus, dass die Extinktionen und Konzentrationen mindestens bis 0.4 mg% Formaldehyd vollkommen proportional sind. Aus 10 Messungen mit 0.1 mg% iger Lösungen und 4 Messungen mit 0.2 mg% iger Lösungen ergab sich der durchschnittliche f-Wert (d.h. mg%/E) 0.530.

Abb. 5.

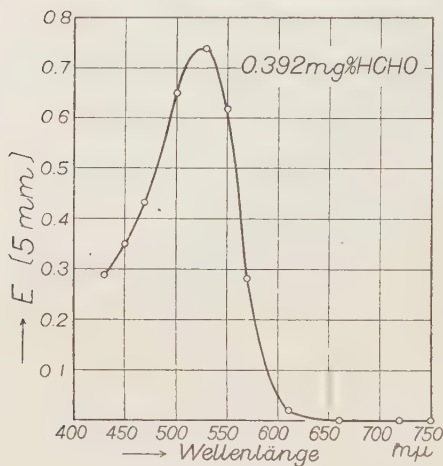
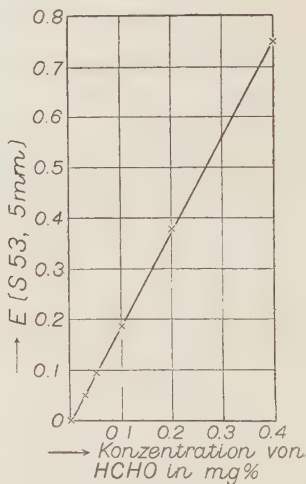


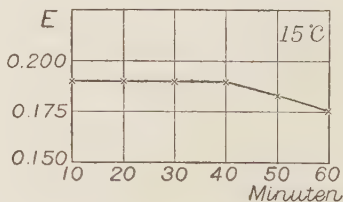
Abb. 6.



7. Beständigkeit der gefärbten Lösung.

0,1 mg% ige HCHO-Lösung wird vorschriftsmässig behandelt und die Extinktion der entstandenen Farblösung zeitlich bei 15°C verfolgt. Wie aus Abb. 7 ersichtlich ist, bleibt die Extinktion bis 40 Minuten konstant.

Abb. 7.



8. Spezifität der Methode.

Von den biologisch in Betracht kommenden Aldehyden sind Glycerinaldehyd und Acetaldehyd, wie Tabelle I zeigt, selbst bei

1%iger Lösung für die Bestimmung praktisch fast belanglos. 1%ige alkoholische Isobutylaldehyd- und Benzaldehydlösung¹⁾ zeigen orange Farbe. Ausserdem prüfte ich folgende Stoffe (etwa 0,1%): Glucose, Fructose, Ascorbinsäure, Glutathion, Harnstoff, Glykokoll, *l*-Tyrosin, *l*-Cystein, *l*-Methionin, *l*-Arginin, *l*-Histidin, *l*-Tryptophan, Glycylglycin, Harnsäure, Gallussäure, Gerbsäure, Methylglyoxal, Eieralbumin, Gelatine, *d*-Gluconsäure. Aber keines zeigte rote Farbe wie Formaldehyd. Alles war leicht gelb bis gelb und kommt für Formaldehydbestimmung praktisch kaum in Betracht.

TABELLE I.

Art	Konzentration	Farbe	
		Sofort	Nach 15 Minuten bei 15°C
Glycerinaldehyd	1%	Rotorange	Leicht rotorange. Blasst sofort ab. (entsprechend 0,139 mg% HCHO).
Acetaldehyd	1%	Gelborange	Leicht gelborange. Allmählich entfärbt.
Aldol	ca. 0.1%	Schmutzig gelb	Schmutzig gelbgrün

9. Zusatzversuch.

Wenn man zu 1,0 cem neutralisierter Bouillon 1,0 cem 0,2 mg %iges HCHO zusetzt und vorschriftsmässig bestimmt, so findet man wegen der Hemmung der Farbenreaktion durch Bouillonbestandteile etwa 66% des zugesetzten Formaldehyds wieder. Bei der 10 fach verdünnten Bouillon ergibt sich 96%, bei mehr als 20 fach verdünnter 100% des Zusatzes.

Wenn man aber zu 1,0 cem neutralisierter Bouillon 1,0 cem 2 mg%iges HCHO zusetzt und dann auf 20 fach verdünnt und vorschriftsmässig bestimmt, so kann 100% des zugesetzten Formaldehyds wiedergefunden werden. Da die Toxin-Lösung zu Untersuchungen des Formaldehyds mehr als 100 fach verdünnt wird, kann kein Einfluss der anderen Aldehyde oder Bouillonbestandteile

1) Beide Aldehyde sind in Wasser kaum löslich.

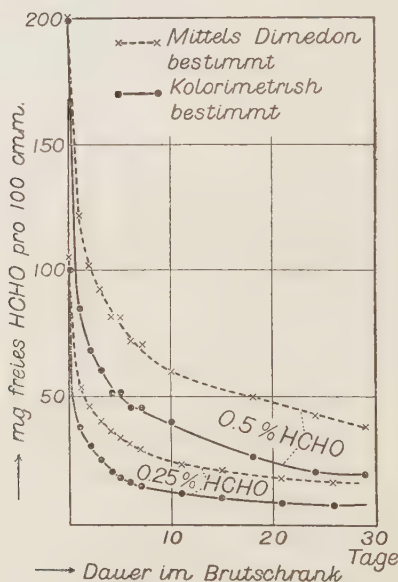
auftreten. Bei 1%iger Ammoniumsulfat- oder Glykokollösung¹⁾ wird die zugesetzte Menge des Formaldehyds vollkommen wiedergefunden.

II. VERSCHWINDEN DES FREIEN FORMALDEHYDS IN DER ROHTOXINLÖSUNG IM VERLAUF DER TOXOIDUMWÄNDLUNG.

Um zu erfahren, welche Aenderung des freien Formaldehyds während der Umwandlung des Toxins ins Toxoid stattfindet, habe ich von der Toxinlösung den Formaldehydgehalt sowohl oxydimetrisch mit Dimedon als auch direkt kolorimetrisch zeitlich verfolgt.

Das untersuchte Material war Bouillonkultur sehr virulenter Diphtheriebazillen. Nach der Zentrifugierung (20 Minuten mit der Geschwindigkeit von 3000 Touren pro Minuten) wurde die überstehende Flüssigkeit abpipettiert und durch Berkefeld-Filter

Abb. 8.



1) Vgl. Matsukawa (1939, 2).

V filtriert. Das PH war 8,5. Gesamt-N: 3,490 mg pro ccm, $\text{NH}_2\text{-N}$ (mit der modifizierten Formoltitrationsmethode gemessen.¹⁾) 0,715 mg pro ccm. $\text{NH}_3\text{-N}$ (nach Vakuumdestillation nach van Slyke¹⁾: 0,144 mg pro ccm. M.L.D.: 0,002 ccm. Lf: 5,8 pro cm. Kf: 45 Minuten.

Zu diesem Filtrat im Kolben setzt man von dem käuflichen Formalin (P.J.V.) auf 0,25 bzw. 0,5% zu, schliesst mit Gummipfropfen fest zu und ein aliquoter Teil desselben wird ab und zu abpipettiert und gemessen.

Die Ergebnisse sind in Abb. 8 gezeichnet. Wenn man die beiden Werte vergleicht, so ist es augenscheinlich, dass die kolorimetrisch bestimmten Werte immer deutlich kleiner als die mit der Dimedonmethode bestimmten sind. Da die Bindung des Formaldehyds mit Dimedon sehr fest ist, so liegt es sehr nahe anzunehmen, dass die Unterschiede der beiden Werte die reversibel gebundenen Anteile des Formaldehyds darstellen.²⁾ Wie aus der Kurve hervorgeht, wird von dem zugesetzten Aldehyd schon innerhalb 24 Stunden ein bedeutender Teil gebunden, während die weitere Bindung sehr allmählich steigt. Das gebundene Formaldehyd ist nach 30 Tagen je nach dem zugesetzten Formaldehyd verschieden. Je kleiner die zugesetzten Formaldehydkonzentrationen, desto weniger Aldehyd wird gebunden und es zeigt kaum eine Neigung, diese noch weiter zu vermehren, wie ich schon in der vorangehenden Mitteilung (Matsukawa 1939, 1) hervorgehoben habe. Wieviel von der beobachteten Abnahme des Aldehyds durch Toxin selbst hervorgebracht worden ist, soll nach Herstellung des reinen Toxins später erneut geprüft werden.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Es wurde eine für Formaldehyd sehr spezifische und hoch empfindliche kolorimetrische Bestimmungsmethode beschrieben.
2. Der Verlauf der Änderung des freien Formaldehyds

1) Vgl. Matsukawa (1939, 2).

2) Da das Dimedon andere Aldehyde ausser Formaldehyd auch mitfällt, können die Unterschiede wenigstens teilweise von den etwa gebildeten anderen Aldehyden hervorgerufen worden sein.

während der Umwandlung des Toxins ins Toxoid wurde sowohl direkt kolorimetrisch als auch nach Fällung durch Dimedon oxydimetrisch verfolgt und die Unterschiede der beiden Werte hervorgehoben und diskutiert.

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Dr. Akiji Fujita ausgeführt, dem ich hier meinen herzlichen Dank ausspreche.

LITERATUR.

- Bloor (1928): J. Biol. chem., **77**, 53.
Collins u. Hanzlik (1916): J. Biol. Chem., **25**, 231.
Fricker (1937): Dissertation Zürich, 1937.
Hyman (1930): Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, Washington, 3rd Edition.
Matsukawa (1939, 1): Saikingaku-Zasshi, **520**, 1.
Matsukawa (1939, 2): Saikingaku-Zasshi, **520**, 10.
Nieloux (1927): Bull. Soc. Chim. Biol., **9**, 639, 758.
Schryver u. Wood (1920): Analyst, **45**, 164.
Velluz (1932): C. r. Soc. Biol., **111**, 289.
Wadsworth u. Pangborn (1936): J. Biol. Chem., **116**, 423.
Zhitkova, Kaplum u. Ficklen (1936): Estimation of Poisonous Gases and Vapors in the Air.

ÜBER DIE KOLORIMETRISCHE MIKROBESTIMMUNG DES KUPFERS.

VON

ISAMU NUMATA UND DANJI MATSUKAWA.

*(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts
in Tokio. Direktor: Dr. Akiji Fujita.)*

(Eingegangen am 26. Juli 1939)

Zur Untersuchung der Ascorbinsäureoxydase sind wir genötigt, den Kupfergehalt genau zu bestimmen. Wir prüften die bisher angegebenen kolorimetrischen Bestimmungsmethoden, dabei fanden wir, dass die Cryogeninmethode von Sarata (1933) unzuverlässig ist, weil die Farbe von der Gegenwart des Sauerstoffs abhängig, die Extinktion der Cu-Konzentration nicht proportional, und die Isolierung des Cu als CuS sowie die Befreiung der anderen Metalle ausser Cu schwierig ist.¹⁾ Die Methode von Elvehjem u. Lindow (1929) ist aber zu unempfindlich, so dass sie für unsere Zwecke kaum in Betracht kommt.¹⁾ Schliesslich erwies es sich, dass die Dithizonmethode von Fischer u. Leopoldi (1933) trotz einiger Umständlichkeit die zuverlässigste von den bisher angegebenen Methoden ist, unter der Voraussetzung, dass eine bestimmte Vorschrift genau befolgt wird. Da die Methode in der Originalarbeit nur kurz behandelt, und die nötigen Bedingungen und Vorsichtsmassregeln nicht genau berichtet worden sind, haben wir die Methode eingehend untersucht und in der vorangehenden Mitteilung (Ebihara, Numata, u. Matsukawa 1939) ausführlich beschrieben. Nach weiter fortgesetzten Versuchen scheint es uns nötig zu sein, die genaue endgültige Vorschrift hier von neuem zu beschreiben, da wir die Methode seitdem in einigen Punkten etwas berichtigt und verbessert haben.

1) Vgl. Ebihara, Numata u. Matsukawa (1939).

REAGENZIEN.

1. *Herstellung der Dithizon-Stammlösung.*

10 mg Dithizon (pro analysi, Takeda) werden in 50 ccm CCl_4 gelöst und in Scheidetrichter gebracht. Gleiches Volumen Ammoniaklösung¹⁾ wird zugesetzt und tüchtig geschüttelt, dabei geht das sämtliche Dithizon in die wässrige Phase über. Die beigemischten gelben Oxydationsprodukte bleiben in CCl_4 -Phase, die abgeworfen werden. 50 ccm CCl_4 werden der wässrigen Lösung hinzugefügt. Es wird mit etwa 25 ccm 1%iger Schwefelsäurelösung tüchtig geschüttelt, wobei das Dithizon in CCl_4 -Phase übergeht und sich schön grün färbt. Die letztere Lösung wird mehreremale mit 2 bis 3 Volumen Wasser gewaschen, in die braune Flasche gebracht, mit halbem Volumen Schwefligesäure-Lösung²⁾ überschichtet und im Eisschrank aufbewahrt. Dieses Reagens erwies sich wenigstens 10 Monate lang brauchbar.

2. *Herstellung der verdünnten Dithizonlösung.*

Die obengenannte Stammlösung wird mit 3 Volumen destilliertem Wasser 3 mal gewaschen und mit CCl_4 aufs dreifache verdünnt. Zur Bestimmung wird diese verdünnte Lösung verwendet. Diese gewaschene Lösung ist nicht mehr als 1 Tag brauchbar.

AUSFÜHRUNG.

1. *Schritt.*

a ccm der zu prüfenden Lösung (mit weniger als 6γ Cu) werden in einen Scheidetrichter (mit ca. 50 ccm Inhalt) gebracht und mit destilliertem Wasser auf 5,0 ccm aufgefüllt. Dazu gibt man 1,0 ccm 10%ige H_2SO_4 -Lösung und 3,0 ccm Dithizonlösung und schüttelt 5 Minuten.

Anmerkung: Wenn der Cu-Gehalt kleiner als 4γ ist, so zeigt sich die CCl_4 -Phase dunkelgrün. Bei 6γ Cu färbt sie sich dunkelviolett. Bei 10γ Cu wird sie rotviolett, was die ungenügende

1) Zu 1 ccm konzentrierter Ammoniaklösung werden 200 ccm Wasser zugesetzt.

2) Etwa 12%ige Lösung von $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 1 n H_2SO_4 .

Dithizonmenge anzeigt.

2. Schritt.

Die CCl_4 -Phase wird in ein kleines Zentrifugierglas (etwa 25 ccm Inhalt) aufgenommen und die wässrige Phase wird abgeworfen. Den an der Oberfläche schwebenden CCl_4 -tropfen lässt man im Scheidetrichter bleiben. Die CCl_4 -Phase im Zentrifugierglas wird durch Kapillarpipette in den Scheidetrichter gebracht und die etwa übrigbleibenden CCl_4 -Reste im Zentrifugierglas mit 1,0 ccm CCl_4 gewaschen und quantitativ in den Scheidetrichter gebracht.¹⁾ Dazu setzt man 4,0 ccm Ammoniaklösung (1:200) und schüttelt 2 Minuten (etwa dreimal pro Sekunde). Die CCl_4 -Phase (dem Kupfergehalt proportional rotviolett gefärbt) wird in das Zentrifugierglas genommen und die wässrige Ammoniaklösung²⁾ wird abgeworfen. Der an der Oberfläche schwebende CCl_4 -tropfen wird im Scheidetrichter gelassen. Die CCl_4 -Phase im Zentrifugierglas wird mit einer Pipette möglichst quantitativ in den Scheidetrichter gebracht. Das Zentrifugierglas wird zweimal mit 2,0 ccm Ammoniaklösung gewaschen und die Waschlösung in den Scheidetrichter gebracht. Dann schüttelt man 2 Minuten wie oben beschrieben. Das Waschen mit Ammoniaklösung wird *im ganzen siebenmal* wiederholt.

3. Schritt.

Die CCl_4 -Phase wird in den Scheidetrichter gebracht. Das Zentrifugierglas wird mit kleiner Menge CCl_4 gespült, welches man in den Scheidetrichter bringt. 5 ccm 1%iges H_2SO_4 werden zugesetzt und 1 Minute geschüttelt. Bei Gegenwart des Kupfers färbt sich die CCl_4 -Phase violett. Kontrolle ist wasserklar und zeigt keine Extinktion. Mittels Filtrierpapier, welches vorher mit CCl_4 benetzt wird, filtriert man die CCl_4 -Phase ins Reagensglas mit markierten Skalen. Die Wässrige Phase wird abgeworfen. Der an der Oberfläche schwebende CCl_4 -Tropfen sowie die an der

1) Die CCl_4 -Phase im Scheidetrichter beträgt dadurch 4,0 ccm.

2) Die wässrige Ammoniaklösung ist gelbbraun und mit den Wiederholungen des Waschens wird die Farbe allmählich dünner.

Wand haften bleibenden CCl_4 -Spuren werden mit kleiner Menge CCl_4 gewaschen und filtriert. Die CCl_4 -Lösung wird mit CCl_4 auf 5,0 ccm aufgefüllt.

4. Schritt.

Man nimmt die CCl_4 -Lösung in die 5 mm-Küvette¹⁾ und photometriert mit Pulfrich-Photometer (S 55). Die Messung muss *innerhalb 10 Minuten*²⁾ nach dem 3. Schritt ausgeführt werden. Die Kupfermenge $x\gamma$ pro ccm der zu bestimmenden Lösung wird nach der folgenden Formel berechnet.

$$x = \frac{16}{a} \cdot E$$

wobi a die verwendete Menge der zu bestimmenden Lösung in ccm, E die gemessene Extinktion bedeutet.

Anmerkung. 1) Die f -Werte sind aus den 4 Messungen mit 2,0 ccm der Lösungen mit 2γ Cu pro ccm berechnet.

Alle gefundenen Werte waren übereinstimmend (S 55, $d=5,00$ mm) : 0,250

$$\text{Also } f = \frac{4}{0,250} = 16,0$$

Diese Werte sind mindestens zwischen 15 bis 37°C von der Temperatur unabhängig.

2) Dass die Extinktionen den Kupferkonzentrationen genau proportional sind (wenigstens bis 4γ Cu), zeigen die Ergebnisse in Tabelle I.

TABELLE I.

Kupfermenge $A\gamma$	S 55, 5,05 mm		S 53, 5,05 mm	
	E	A/E	E	A/E
1	0,06	(16,7)	0,060	(16,7)
2	0,125	16	0,115	17,4
4	0,250	16	0,235	17,0
6	0,350	(17,1)	0,340	(17,7)

1) Bei kleiner Kupfermenge verwendet man lieber 10 mm-Küvette.

2) Wenn E kleiner als 0,1, nimmt die Extinktion nach 10 Minuten ab.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode des Kupfers nach Fischer-Leopoldi wurde ausführlich beschrieben. Unter Beibehaltung der beschreibenden Bedingungen kann diese Methode als eine genaue und zuverlässige bezeichnet werden.

Herrn Dr. Akiji Fujita sprechen wir hier unseren besten Dank für seine freundliche Leitung bei dieser Arbeit aus.

LITERATUR.

- Ebihara, Numata u. Matsukawa (1939): Tokyo Ijishinshi, **3125**, 15.
Elvehjem u. Lindow (1929): J. biol. Chem., **81**, 438.
Fischer u. Leopoldi (1934): Angew. Chem., **47**, 90, 685.
Sarata (1933): Jap. J. med. Scien., II, **2**, 247.

THE SIMULTANEOUS MICRO DETERMINATION OF
VARIOUS FRACTIONS OF LIPIDS (PHOSPHOLIPID,
CHOLESTEROL AND FAT), TOGETHER WITH
THE DETERMINATION OF THEIR
IODINE NUMBERS.

BY

MORIO YASUDA AND KORENORI OHNO.

*(From the Biochemical Laboratories, Institute for Research in Physical
Education, Ministry of Education, and Institute of Public Health,
Ministry of Welfare, Tokyo.)*

(Received for publication, August 18, 1939)

As is generally recognized, phospholipid, cholesterol and fat are regarded as the three major and most important fractions of the lipids. Their universal existence in blood, tissues and organs is not only significant, but the close interrelationship between them has led to the prevailing view that biological studies of lipids should be made simultaneously with observations of all these fractions. In previous papers one of us has reported on the determination of cholesterol (Yasuda, 1931, 1936), and the determination of the iodine number of lipids including sterols (Yasuda, 1931-32, 1937-a).

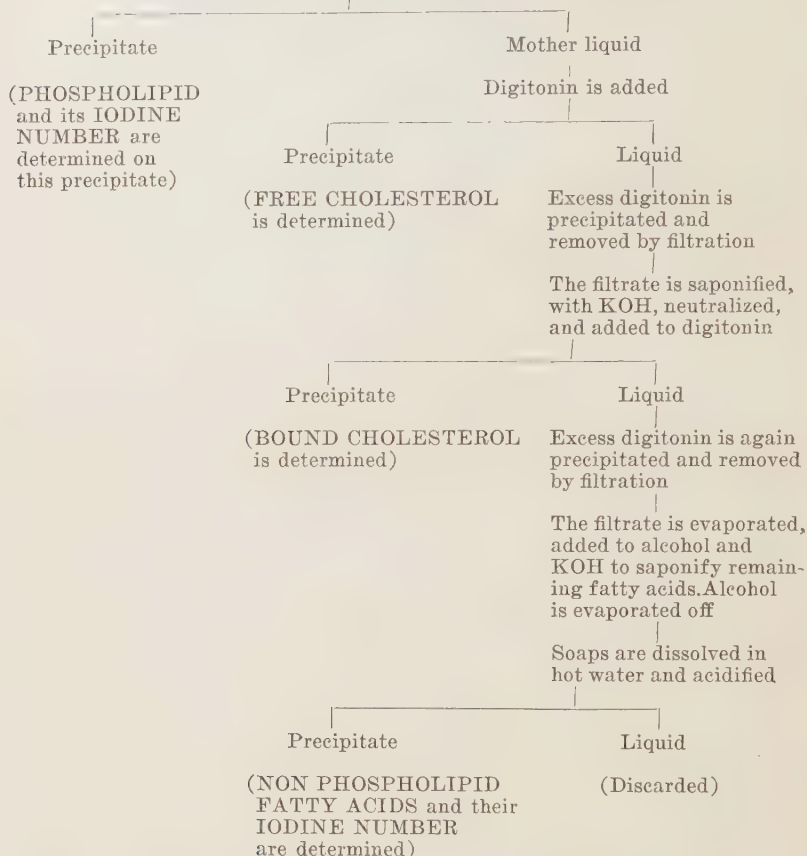
In this publication we are attempting to describe a method by which all the important lipids are successively separated from the alcohol-ether extracts of biological materials and are determined thereafter.

The principles of our method are schematically illustrated below:

The main features of these principles are 1) each lipid fraction is precipitated and separated before the determination, 2) after one fraction is separated, the residue which has usually been wasted off, is used for the separation of another fraction so that a much lesser amount of material would suffice for the, so-to-speak, differential analysis of lipids, than in other methods so far available.

It is obvious that the quantitative separation of lipids is of

The alcohol-ether extract is first evaporated to dryness, and extracted with petroleum ether. The petroleum ether extract is concentrated, and then acetone and electrolyte (MgCl_2) are added



(Note. Neutral fat is obtained by following calculations:

Non phospholipid F.A. - Bound cholesterol F.A. = Neutral fat F.A.

Neutral fat F.A. \times factor = Neutral fat)

vital importance in this case. We are quite familiar with the separation of phospholipid by acetone, and of cholesterol by digitonin, but the precipitation of fatty acids and their subsequent determination have not been likewise studied. We have therefore experimented first on the standard solutions of different fatty acids, and some of the commercial fats and oils with respect to the

quantitative precipitation of fatty acids. We found that the separation of fatty acids, either saturated or unsaturated, was satisfactory and that their iodine numbers were not changed by the procedures of separation.

The complete precipitation of phospholipid, regarding which questions have often been raised, was next demonstrated. Then, we have seen that the application of the principles aforementioned to the tissue extracts gave agreeable results. We were therefore convinced that our method, presented here, would enable one to determine all important lipids simultaneously, together with their iodine numbers, on a small amount of material.

EXPERIMENTAL.

Precipitation of fatty acids—As substrates, palmitic acid (Merek, Extra pure) and oleic acid (Kahlbaum) were used. From 0.1 and 0.5 per cent chloroform solutions of these fatty acids, suitable aliquots (as indicated in Table I) were taken into small flasks of 50 cc. volume. Chloroform was first evaporated, then the residue was added to 10 cc. of redistilled alcohol, heated for a few minutes on the water bath to dissolve the fatty acids in hot alcohol, and titrated, while still hot, with $N/50$ NaOH. As an indicator, one drop of phenolphthalein was used. Blank titration for alcohol only was likewise carried out.

About the same aliquots of chloroform solution of palmitic acid were measured into small flasks. After the chloroform was removed by evaporation, the residue was dissolved in about 5 cc. of hot alcohol, added to 0.1 cc. of watery saturated solution of KOH and heated on the water bath gently for about 20 minutes to saponify the fatty acid. The remaining alcohol was removed by evaporation and the residue was added to about 10 cc. of distilled water and heated on the water bath for a while to dissolve the soap. After cooling, the contents of the flask were acidified to precipitate the fatty acid, by adding 0.5 to 1 cc. of H_2SO_4 (made by mixing equal parts of H_2SO_4 and water), and placed in ice cold water for about 1 hour. The precipitate of fatty acid was separated by filtering through the glass filter which is used for the deter-

mination of cholesterol (see Yasuda, 1936). The precipitate of fatty acid in the filter was washed four times with 5 cc. portions of cold water, whereby traces of H_2SO_4 used for the precipitation of the fatty acid were completely removed. Lastly, the fatty acid in the filter was dissolved in hot alcohol, filtered into a small flask, and titrated with NaOH as before. The recovery of palmitic acid after the above treatment is shown in Table I. The same experiments were done on oleic acid. It is certain that the precipitation of fatty acids and their separation by filtration were quantitative, although the recoveries were about 5 per cent lower than the theory.

TABLE I.
Determination of fatty acids by titrating with alkali.

Mode of experiment	Materials	Fatty acids recovered		
		N/50 NaOH needed	Amount of fatty acids	Difference from theory
I*	mg.	cc.	mg.	per cent
	Palmitic acid 5.0	0.93	4.75	-5.0
	" "	0.93	4.75	-5.0
	Oleic acid 4.5	0.75	4.23	-6.0
	" "	0.76	4.23	-6.0
II	Palmitic acid 3.0	0.55	2.83	-5.6
	5.0	0.93	4.73	-5.4
	" "	0.96	4.88	-2.4
	6.0	1.13	5.76	-4.0
	" "	1.12	5.71	-4.8
	" "	1.08	5.54	-7.6
	Oleic acid 4.5	0.78	4.42	-1.8
	" "	0.75	4.23	-5.8
III	Palmitic acid 4.5 +	(Theory 1.68)		
	Oleic acid 4.5	1.56		-7.7
	" "	1.55		-7.2
	Palmitic acid 3.0 +	(Theory 1.12)		
	Oleic acid 3.0	1.04		-7.1
	" "	1.06		-5.3
	" "	1.11		-1.0

- * I. Fatty acids dissolved in alcohol were directly titrated.
 II. Fatty acids were saponified, and then acidified. The precipitated fatty acids were isolated by filtration, dissolved in alcohol and titrated with alkali.
 III. The saponification (as in the case of II) and digitonin treatment were carried out, see text.

Influence of digitonin upon the precipitation of fatty acid—

From routine experiments we had the impression that digitonin might prevent the precipitation of fatty acid in a watery medium. Since digitonin is used for the separation of cholesterol and the residue which is free from cholesterol, but contains excess digitonin, and which is to be used for the analysis of fat fatty acids as previously indicated, the influence of digitonin on the precipitation of fatty acids, if any, would be a problem of great concern. We have therefore tried the following experiment:

After the procedures of cholesterol (bound cholesterol) determination (Yasuda, 1936), 15 mg of cholesterol palmitate and 3 mg of palmitic acid were taken into small flasks and added to 0.1 cc. of saturated KOH. The contents of the flasks were heated gently on the water bath for about 20 minutes, then neutralized with dilute HCl. After that, 2 cc. of 0.5 per cent digitonin solution (10 mg of digitonin), which is used for cholesterol determination, were pipetted in one series, and 4 cc. of the same digitonin solution to another series of experiments. The flasks were heated on the water bath until the contents became dry as in the case of cholesterol determination. 10 cc. of diluted acetone (made by combining equal parts of acetone and water) were poured into the above flasks with 0.1 cc. of KOH solution, and heated on the water bath to dryness (by this procedure the fatty acids in the flasks were saponified again). Then, the contents were dissolved in 10 cc. of hot water, acidified with H_2SO_4 and cooled.

The fatty acid ought to have been deposited as already described in the previous chapter. But this was not the case; the contents of flasks only became turbid. There was no doubt that digitonin had prevented the precipitation of fatty acid.

Removal of Digitonin—We have attempted various experiments to remove digitonin, and it was found out finally that the principle applied in cholesterol determination was good enough for this purpose—that is, the mixture of fatty acid and digitonin was made dry, then dissolved in a small amount of glacial acetic acid by gentle heating. When ether was added, the digitonin precipitated promptly and was removed by filtration or by centri-

fuging. The details of this procedure will be described later. After digitonin was removed the remaining fatty acid was saponified and the soap thereby produced was dissolved in hot water. Upon acidification the fatty acid precipitated quantitatively and was separated by filtration as noted elsewhere. In the last column of Table I are seen some of the experiments in which digitonin was added to the fatty acid mixture and removed before the fatty acids were precipitated.

Experiments on oleic acid—Since the separation of unsaturated fatty acid (which has been partly demonstrated in Table I) appeared to need additional experiments, oleic acid was used as the material for testing the completeness of separation of such fatty acid and the change of its nature during the course of separation.

4 cc. of 0.25 per cent chloroform solution of oleic acid were taken into a small Erlenmeyer flask, the chloroform was evaporated off, and the residue was dissolved in 10 cc. of an alcohol-ether (3:1) mixture. Then it was saponified with 0.1 cc. of saturated KOH on the water bath for 20 minutes. The contents of the flask were neutralized with dilute HCl, and added to 10 mg of digitonin. The digitonin was removed, then the fatty acid was precipitated and separated by filtration, after the procedure already stated. The precipitate of oleic acid was finally dissolved in hot alcohol and filtered into a 10 cc. volumetric flask. This alcoholic solution of oleic acid was subjected to twofold determinations; one, the neutralization with $N/50$ NaOH (Alkali-titration method in Table II), and the other, the oxidative method of Bloor. At the same time the determination of the iodine number was done. The results of the above experiments, which were repeatedly carried out, are shown in Table II.

It was striking that the recoveries of oleic acid in these experiments were consistent, and the values either by alkali titration or by the oxidative method were nearly the same as was expected, and that the iodine number was not changed more than to a negligible extent, showing that the nature of oleic acid was not affected by the various treatments recorded above.

Experiments on some commercial fat and oils—An alcohol-

TABLE II.

The influence of the saponification and the digitonin treatments upon the precipitation and subsequent isolation of oleic acid.

Aliquot oleic acid	Series of the experiments	Recovery of oleic acid by		Iodine number
		Alkali-titration method	Oxidative method	
4 cc. of 0.25 per cent chloroform solution of oleic acid; i.e., 10 mg of this fatty acid	I	mg.	mg.	89.5
		8.82	8.80	
		8.98 (8.90)*	8.84 (8.83)	
	II		8.84	82.5
		9.10	8.78	
		8.95 (9.03)	8.91 (8.85)	
	III		8.85	88.0
		9.25	8.77	
		9.30 (9.27)	9.03 (8.94)	
	IV		8.98	88.6
		9.27	9.10	
		9.27 (9.27)	9.02 (9.05)	
V			9.02	91.0
		9.45	8.82	
		9.36 (9.40)	8.98 (8.85)	
			8.74	

* Figures in parenthesis show the average values.

ether solution of lard containing 50 mg of this fat was taken into a flask of 100 cc. volume and saponified with 0.5 cc. of saturated KOH for 20 minutes on the water bath. The remaining alcohol-ether was removed by evaporation, then the residue was added to about 30 cc. of water and heated on the water bath for a few minutes. Soaps of lard fatty acids were thereby dissolved in hot water, from which the fatty acids were deposited off by acidifying with H_2SO_4 and cooling in ice cold water. Fatty acids were separated by filtering through a glass filter, it was washed four times with 10 cc. portions of cold water, then dissolved in hot alcohol and filtered into a 25 cc. volumetric flask. 3 cc. of this alcohol

solution were used as aliquots for the determination of fatty acids by titrating with NaOH (*N*/50). The oxidative determination of fatty acid and the determination of the iodine number were also applied to another aliquot of the same solution. Similar experiments were done on cod liver and linseed oils. The results are shown in Table III.

TABLE III.
Determination of fatty acids and their iodine numbers in fat and oils.

Materials	Approximate amount of fatty acids*	Recovery of fatty acids		Iodine number of fatty acids**
		Alkali-titration method	Oxidative method	
Lard	mg. 50.0	mg. 41.6	mg. 40.7	77.1
"	"	43.8	41.9	74.6
Cod liver oil	20.0	16.7	15.7	131.0
"	"	16.7	16.0	129.0
"	"	16.7	15.7	131.0
"	"	16.6	15.4	136.5
Linseed oil	20.0	17.5	16.3	162.5
"	"	17.5	16.3	161.5
"	"	17.6	16.7	160.5

* The amount of fat and oils were multiplied by 0.95.

** The amount of fatty acids determined by the oxidative method was used in the calculation of the Iodine number.

In the determination of mixed fatty acids, as in the above cases, calculations were made on the following assumption:

The amount of palmitic acid to be neutralized by 1 cc. of *N*/50 NaOH is 5.15 mg; those of stearic, oleic, linolic and linoleic acids are 5.67, 5.65, 5.60, and 5.56 mg respectively. The average of these values is nearly 5.50. Therefore, when various fatty acids are mixed in different ratios, it can be assumed that the amount of fatty acids corresponding to each cc. of *N*/50 NaOH is 5.50 mg.

In the oxidative method in which fatty acids are calculated

from the amount of $K_2Cr_2O_7$ needed for the oxidation of fatty acids, it is assumed that each mg of mixed fatty acids needs 3.60 cc. of $N/10 K_2Cr_2O_7$. (Note. The amount of $N/10 K_2Cr_2O_7$ to be needed for the oxidation of 1 mg of palmitic, stearic, oleic and linolic acids are 3.59, 3.66, 3.61 and 3.57 cc. respectively.)

In Table III we see that the determination of fatty acids of various fats and oils by our method gives strikingly consistent results, and that the fatty acids of a high grade of desaturation, such as those of linseed oil, are separated and determined with ease, as are the fatty acids of lard, which have a much lower iodine number. We at first doubted whether or not the fatty acids of high desaturation could be quantitatively precipitated and separated, even though the separation of saturated fatty acids, like palmitic acid, or fatty acids of low desaturation, like oleic acid, can be carried out successfully. But experiments on cod liver and linseed oils would probably remove such doubts. Since fatty acids of the neutral fat of animal tissues or organs are usually much less desaturated than the above oils, their separation and subsequent determination could be done without difficulties. As may be seen in the experiments on oleic acid in Table II, the determination of fatty acids of fat and oils by the oxidative method gives values a little lower than the alkali titration method, but the difference is so slight that both methods can be applied with the same accuracy. The objection attributed to the oxidative method that contaminated impurities are oxidized at the same time is invalid, since fatty acids are separated and freed from impurities by repeated washings before they are determined.

It may not be necessary to state that the relatively low percentage recoveries of fatty acids in Table III were probably due to the fact that the materials were for commercial use, and were not purified before they were taken for analysis.

The separation of phospholipid—As already mentioned, the first step of our lipids analysis is the separation of the phospholipid fraction from the alcohol-ether extracts of tissues. We have tested the completeness of the separation of phospholipid in the experiments below:

Alcohol-ether extracts of rat liver, rabbit plasma and human brain containing about 5 to 10 mg of phospholipid (Table IV) were taken into flasks as usual and evaporated almost to dryness. The residue was extracted with about 25 cc. of petroleum ether in three successive portions. Petroleum ether was collected in a tube and

TABLE IV.
Isolation of phospholipid by acetone and electrolyte (MgCl_2).

Materials	Aliquot alc.-ether extract	Phospholipid in aliquot (by oxidative method)	*Identification of phosphorus remaining.			
			In 1st mother liquid		After the reprecipitation of phospholipid	
			by color reaction	Strychnine precipitation	by color reaction	Strychnine precipitation
Rat liver-A (1.715 gm. in 200 cc. alcohol-ether)	cc.	mg.				
	30	6.94	(+)	(+)	(+)	(±)
	40	9.33				
Rat liver-B (1.088 gm in 100 cc. alcohol-ether)	30	4.93			(+)	
	30	4.86		(+)		(±)
Rat liver-C (1.973 gm. in 250 cc. alcohol-ether)	15	3.41	(±)			
	15		(±)			
	15			(±)		(±)
	20	4.53				(±)
Rabbit plasma (17 cc. plasma in 250 cc. alcohol-ether)	48	4.60			(±)	
Human Brain, Gray matter (1.190 gm. in 250 cc. alcohol-ether)	10	3.63		(++)		(±)
	15	5.13	(++)		(±)	
	10	3.58	(+)		(±)	
	15	5.33		(+)		

* Phosphorus was identified by the color reaction of Fiske-Subbarow and by the Strychnine precipitation method after Tisdall.

++ show that the amount of P is about 0.005 mg.

+ " " 0.0025 mg.

± shows that neither the color reaction nor the precipitation with strychnine is clear.

centrifuged, the supernatant liquid was transferred to another centrifuge tube, concentrated and added to acetone and MgCl_2 after procedures which will be described later. Phospholipid that precipitated was separated by centrifuging from the mother liquid. The latter was decanted into a large test tube (for Micro Kjeldahl), the solvents were removed by evaporation, then the residue was digested with H_2SO_4 and perhydrol on a small flame, to be subjected to the identification of Phosphorus. In one case the color reaction of Fiske and Subbarow (1925) was applied, while in the other, Phosphorus was precipitated as strychnine phosphomolybdate, after Tisdall (1922).

The separated phospholipid was dissolved in a small amount (about 2 cc.) of petroleum ether, and reprecipitated by acetone (7 cc.) and MgCl_2 (1 drop). After centrifuging, the supernatant mother liquid was again subjected to the identification of phosphorus. The reprecipitated phospholipid was dissolved in chloroform, and determined by the oxidative method on suitable aliquots. All the results are presented in Table IV.

In all cases, the phosphorus remaining in mother liquids after the separation of phospholipid was negligible. Accordingly, we believe that we have given sufficient data for the statement that the precipitation and separation of phospholipid under the conditions given above are good enough for ordinary determination.

PROCEDURES OF SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MAJOR LIPID FRACTIONS.

Based on the experiments in the previous chapter, the method of our lipids analysis which was schematically expressed at the beginning of this paper consisted of the following procedures:

About 100–150 cc. of alcohol-ether extract (the amount of the extract to be taken for analysis may be adjusted according to the amount of lipids in the extract) are measured into an Erlenmeyer flask of suitable size and evaporated almost to dryness on a water or steam bath under gentle suction. The residue is extracted with about 40 cc. of petroleum ether (redistilled

below 60°) in three or four successive portions of about 10 cc. Each time the flask is carefully heated by placing it on a water bath for a while until petroleum ether begins to boil. All petroleum ether (it is convenient to make the volume of petroleum ether to about 15 cc. by evaporation) is decanted into a tube and centrifuged for 5 minutes at 2000 R.P.M. Then the supernatant petroleum ether is transferred into another graduated centrifuge tube and concentrated to about 2 cc, added to 7 cc. of acetone (three or four times as much acetone as petroleum ether) and one drop of saturated alcoholic solution of $MgCl_2$, and stirred with a small glass rod to precipitate phospholipid, which is separated by centrifuging for 5–10 minutes. The supernatant liquid is transferred to a flask of 100 cc. volume (Flask-I). Phospholipid precipitate is washed with about 5 cc. of acetone, centrifuged again, and the wash acetone is decanted into the same flask.

Determination of phospholipid and its iodine number—Phospholipid precipitate in the centrifuge tube is dissolved in chloroform, transferred to a small volumetric flask (15 cc.) and made to the volume.

Aliquots of this chloroform solution containing about 3 mg of phospholipid are pipetted into oxidation flasks (glass stoppered pyrex Erlenmeyer flasks of 120 cc. volume). Some of them are used for the determination of phospholipid by the oxidative method, while others are taken for the micro determination of the iodine number. For the oxidative determination of phospholipid, chloroform in the oxidation flasks is evaporated on the steam bath, and traces of chloroform are removed by suction before 2 cc. of $N K_2Cr_2O_7$ and 5 cc. of NiCloux reagent are pipetted in as oxidizing agents. Further procedures are detailed in the original publication of Bloor (1929). In the determination of the iodine number, the chloroform solution in another oxidation flask is first evaporated to remove traces of acetone, then the remaining phospholipid is redissolved in 5 cc. of chloroform to which pyridine sulfate dibromide is added, otherwise treated after the description of Yasuda (1931–32).

Determination of free cholesterol—Yasuda's method of chole-

sterol determination (1936) is applied; i.e., the acetone and petroleum ether solution in Flask I which is free from phospholipid, but contains cholesterol and neutral fat, is added to the digitonin solution and evaporated slowly to dryness. (The amount of digitonin solution to be added depends on the amount of cholesterol. We usually use 4 cc. of 0.5 per cent alcoholic digitonin solution or about 20 mg of digitonin. The amounts of other reagents should likewise be increased, since larger amounts of cholesterol are to be separated in this case. In most tissues cholesterol exists as free cholesterol, so that a considerably large amount of digitonin is needed for free cholesterol determination. However, when the free cholesterol content is low as, for instance, in cases of suprarenal gland or blood plasma, much less digitonin would be sufficient.) The dried residue in Flask I is added to about 10 cc. of diluted acetone (mixture of equal parts of acetone and water) and heated for few minutes on the water bath or steam bath, whereby the excess digitonin is dissolved. The contents of the flask are next transferred into a glass filter so that the cholesterol digitonide is separated. A filtering apparatus, glass filter, and so forth, described in the previous communication of Yasuda (1936) are needed, and the procedures regarding the separation and purification of cholesterol digitonide by washing with acetone and ether are the same as those of the previous paper. The filtrate, wash acetone and ether are all collected in a flask in the filtering apparatus (Flask II), and used for further determination of bound cholesterol and neutral fat. Cholesterol digitonide in the filter is dissolved in about 2 cc. of hot glacial acetic acid by placing the filter in a steam heated jacket, and filtering into a flask. Digitonin is precipitated by ether and removed by filtration, the filtrate is evaporated off on the water bath with suction, and the residue, which is cholesterol freed from digitonin and impurities, is dissolved in chloroform and transferred to a 10 cc. volumetric flask. On this chloroform solution, cholesterol is determined by colorimetry. Two or more determinations are available, if necessary.

Determination of bound cholesterol—The contents of Flask II, in which is contained bound cholesterol, neutral fat and excess

digitonin, are dried on the water bath, a small amount of glacial acetic acid (1–2 cc.) is added and heated for a while (to dissolve the dried residue). About 10 times as much ether as acetic acid is poured in to precipitate the digitonin. After half an hour, the precipitated digitonin is removed by filtration through a glass filter. The filtrate is evaporated to remove most of ether and acetic acid, the residue is dissolved in about 15 cc. of alcohol, added to 0.2 cc. of saturated watery solution of KOH and saponified for 20 minutes on the water bath, then cooled, neutralized with dilute HCl (one part of concentrated HCl is diluted with four parts of water), and one drop of phenol phthalein used as an indicator. To precipitate the cholesterol freed by saponification, an alcoholic digitonin solution (in most cases 2 cc. is sufficient) is added and concentrated to dryness. Diluted acetone is then added to dissolve the excess digitonin, and cholesterol digitonide (which is insoluble in either acetone or ether) is separated by filtration, washed with acetone and ether as before. The filtrate together with wash acetone and ether are collected in Flask III which is further used for the determination of neutral fat. On the other hand, the separated cholesterol digitonide is treated to remove the digitonin. Cholesterol is then determined.

Total cholesterol—When the content of bound cholesterol is very low, it is given indirectly, as is well known, by the difference between free and total cholesterol. Then, the determination of total cholesterol becomes necessary. After the phospholipid is separated, the mother liquid, i.e. the contents of Flask I in the above description, is divided into one small and one large part. On the former, free cholesterol is determined. The latter is directly saponified with KOH, neutralized with HCl, added to digitonin and so forth to determine total cholesterol. The technique is described in a previous paper (Yasuda, 1936). After cholesterol is separated as digitonide, the rest is used for neutral fat determination.

Determination of non phospholipid fatty acids and their iodine number—The contents of Flask III, consisting of fatty acids derived from neutral fat and bound cholesterol (non phospholipid

fatty acids) and excess digitonin (other digitonin used for bound or total cholesterol determination) are made dry on the water bath, then treated with about 1 cc. of glacial acetic acid and about ten times as much ether to precipitate the digitonin, as elsewhere stated. Digitonin is removed by filtration, the filtrate is collected in a small flask and evaporated on the steam bath almost to dryness, then the residue is dissolved in a small amount of alcohol (5 cc.), and made alkaline by adding a few drops of saturated KOH (it is not necessary to add an indicator, since the phenol phthalein used in cholesterol determination remains). The alcohol is completely evaporated off, then added to 10–15 cc. of water and heated for a minute during which the contents of the flask (soaps) dissolve in hot water. After cooling, 0.5–1 cc. of H_2SO_4 (diluted with an equal part of water) are added and mixed well by shaking. Fatty acids precipitate promptly. The flask is cooled in ice cold water or in an ice chamber for about 1 hour, then the fatty acids are separated by filtering through a glass filter, washed four times with about 5 cc. portions of ice cold water. The last wash water is tested on methyl orange to see that it is not acid.

Finally, the fatty acids in a glass filter are dissolved in hot absolute alcohol and filtered into a small volumetric flask, cooled and made up to volume with alcohol. A part of this alcoholic solution is taken for fatty acid determination either by the oxidative or the alkali titration method. Another aliquot is used for the iodine number determination. In the oxidative method, aliquots containing about 3 mg of fatty acid are measured into oxidation flasks (as in the case of phospholipid determination), the alcohol is completely evaporated off, then the residue is oxidized with 2 or 3 cc. of $\text{N-K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and 5 cc. of Nicloux reagent in an electric oven ($124 \pm 2^\circ\text{C}$) for 15 minutes. Flasks are taken out from the oven, added to about 70 cc. of ice cold water, cooled for few minutes in cold water, and then titrated with $\text{N}/10 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. The titration of the blank is also done, and the amount of fatty acid in aliquots is calculated on the assumption that 1 mg of fatty acid needs 3.60 cc. of $\text{N}/10 \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ for the oxidation, that is

$$(a-b)/3.6 = \text{mg of fatty acid}$$

in which a and b are the number of cc. of $N/10$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in the titration of blank and the sample.

In the alkali titration method, the aliquot alcoholic solutions of fatty acid (which contain about 5 mg of fatty acid) are taken into small flasks, the volume is made up to 10 cc. with alcohol, heated for a while on the water bath, and titrated with $N/50$ NaOH with one drop of phenol phthalein as an indicator. Blanks for alcohol are similarly carried out. Fatty acid is then given,

$$(a-b) \times 5.5 = \text{mg of fatty acid}$$

where a and b are the number of cc. of $N/50$ NaOH used in the titration of the blank and sample.

The alkali titration method is much easier than the oxidative method, but the former needs about twice as much fatty acid as the latter in single determination, so that the oxidative method is preferred when the material is small in quantity.

For the determination of the iodine number, another aliquot of the above alcoholic solution is first evaporated to remove the alcohol, redissolved in 5 cc. of chloroform before the halogenizing reagent is added (see Yasuda, 1931-32).

Determination of neutral fat—The non phospholipid fatty acids are derived from neutral fat and bound cholesterol fatty acids. The latter are obtained by the calculation:

Bound cholesterol (mg) $\times 0.72$ = Fatty acid of Bound cholesterol (mg), since 1 mg of cholesterol combines with 0.736, 0.730, 0.664, 0.725 and 0.720 mg of stearic, oleic, palmitic, linolic and linoleic acid respectively, the average being 0.72.

In the calculation of neutral fat from its fatty acid, Kumagawa and Suto (1908) found the factor 1.046 as most adequate. However, we are using 1.05 as a factor assuming that 95 per cent of the fats are fatty acid. Accordingly, neutral fat is determined after the formula:

Neutral fat = (Non phospholipid fatty acids - Bound cholesterol $\times 0.72$) $\times 1.05$. At present we can not isolate fatty acids of bound cholesterol from those of neutral fat, unless the bound cholesterol is previously separated by making use of its property of

precipitating in cold alcohol. However, this would be possible only when abundant materials are obtainable. In such micro determination as we are searching for in this paper, we ought to be satisfied with the method noted above for the determination of neutral fat.

Examples of lipids analysis—On some of tissue extracts we made determinations of phospholipid, cholesterol, fat and their iodine numbers by our new method. The results are tabulated in Table V.

TABLE V.

Examples of lipid analysis by a new method.

(Lipid content are expressed in mg per 100 gm. of moist tissue or 100 cc. of blood).

Tissues	Amount of alcohol-ether extract taken for analysis	Phospholipid		Cholesterol			Fat			
		Content	I. N.	Free	Bound	Total	Non phospholip. fatty acid	Fat fatty a.	Fat	I. N. of non-phospholipid fatty acid
Rabbit plasma (17 cc. in 250 cc. of alcohol-ether)	cc. 48 (3.26 cc. plasma)	141	62	32	72	104	94	40	42	103
Rabbit blood corpuscle (10 cc. in 250 cc. of alcohol-ether)	150 (6 cc. corpus.)	190	68	108	8	116	39	33	35	98
Rat liver (1.189 gm. in 250 cc. alcohol-ether)	80	2800	106	179	39	218	618	589	618	65
Beef suprarenal gland (1.702 gm. in 250 cc. alcohol-ether)	150	2182	91	288	83	371	805	743	780	
Beef suprarenal gland (2.387 gm. in 250 cc. alcohol-ether)	120	2420	98	341	81	422	925	864	906	

Remarks. 1. As to the preparation of alcohol-ether extracts of tissues the reader is referred to the publications of Bloor and

Snider (1934), Boyd (1936) and Yasuda (1937-b). The extracts used in the experiments of Table V were made after the description of Yasuda (1937-b). The extracts of liver and particularly of blood corpuscle become colored to a considerable extent when they are concentrated, and the color enters the phospholipid fraction. It does not affect the determination of phospholipid materially, but the preparation of tissue extracts free from colored substances (mainly blood or bile pigment) is desired.

2. The reagents and apparatus for the determination of phospholipid and cholesterol, and those of iodine number determination are described in previous communications (Bloor, 1929; Yasuda, 1931-32, 1936). Glass filters and filtering apparatus used in cholesterol determination (Yasuda, 1936) are conveniently used in non phospholipid fatty acid or neutral fat determination.

3. The neutral fat content is markedly low in most tissues or organs except fat tissue or fatty degenerated ones. This is the reason why it is necessary to take a relatively large amount of alcohol-ether extract (100 cc. or sometimes more) at the beginning of the analysis.

DISCUSSION AND SUMMARY.

As repeatedly stated, our method is characterized by the fact that all important fractions of lipids are successively precipitated and separated before they are determined, and that the aliquot of tissue extracts initially taken is thoroughly utilized until the last fraction is separated. Such principles are not only desirable for the economical use of the materials, but they are essential for lipids analysis.

Take, for instance, cholesterol determination as an example. It is reported that digitonin causes the precipitation of phospholipid together with cholesterol (McEwen, 1935) so that phospholipid should be removed prior to the use of digitonin if only the free cholesterol is to be determined (Kelsey, 1939). This phenomenon would undoubtedly affect the determination of cholesterol by gravimetry, although in colorimetric determination, after the cholesterol of digitonide is freed from digitonin (Yasuda,

1936; Kelsey, 1939), the influence would be least. The determination of neutral fat, on the other hand, appears more difficult. In recent methods,—most of which have originated in Bloor's publications (1928, 1929)—phospholipid and cholesterol are determined on different aliquots of the extracts and the total fatty acids are obtained on another aliquot, so that the neutral fat can be calculated by subtracting phospholipid and bound cholesterol fatty acids from the total fatty acids. However, how can we determine the amount of phospholipid fatty acids exactly? If all phospholipids are assumed to be of the lecithin or cephalin type, then the fatty acids would be approximately $2/3$ of the weight of phospholipids. In fact, this factor has been used in the calculation of phospholipid fatty acids on many occasions. But, recent studies have suggested that sphingomyelin which has only one fatty acid for each molecule instead of two is contained in blood and tissues to a considerable extent (Thanhauser a. Setz, 1936; Stewart a. Hendry, 1935). In which case, the above factor becomes unreasonable. Besides, it has been reported that fatty acids recovered after the hydrolysis of phospholipid were much less than the theory (Man a. Gildea, 1937; Stewart a. Hendry, 1935). Therefore, it may be needless to state that the factor mentioned above is difficult to decide, and that the yield of total fatty acids would be lower than expected as far as the hydrolysis of phospholipid is incomplete.

The necessity of separating lipid fractions before the determination is especially emphasized in the case of neutral fat, since the separation of cholesterol and phospholipid prior to their determination is becoming current and the procedures are well known. So far, as stated above, neutral fat has been calculated from total fatty acids by subtracting fatty acids of phospholipid and cholesterol ester, and the total fatty acids were obtained in the following way:

Tissue extract was saponified, acidified, and then extracted with petroleum ether. After the petroleum ether was removed, the residue was oxidized with chromic acid and the fatty acids were calculated from the amount of chromic acid needed. Kirk, Page

et al. (1935) have calculated from the amount of carbon freed in the oxidation, which is determined by gasometry.

However, the disadvantage of this procedure is that the contaminating impurities are oxidized with the fatty acids, as these authors have stated that the fraction they regarded as neutral fat consists of "Neutral fat and unidentified petroleum ether soluble extractives."

Had fatty acids been precipitated, separated, and purified by washing before the determination, as Stoddard and Drury (1929), Man and Gildea (1932-33) reported, the objection raised above would be greatly eliminated. Nevertheless, the low yield of phospholipid fatty acid by hydrolysis and the existence of different types of phospholipids, other than lecithin or cephalin, would damage the determination of total fatty acids and the calculation of phospholipid fatty acids, and as a result the estimation of neutral fat would be less reliable.

In our procedure these difficulties are mostly overcome, since phospholipid is precipitated and removed before fat fatty acids are precipitated.

Thus, the three major fractions of lipids can be precipitated, separated, purified from contaminating substances, and then subjected to quantitative determination one after another. The determination of the iodine number is applied to these isolated fractions at will, and the sum of phospholipid, total cholesterol, neutral fat and fatty acid of bound cholesterol may be defined as "Total Lipids."

BIBLIOGRAPHY.

- Bloor, W. R. (1928): *J. Biol. Chem.*, **77**, 53.
 " (1929): *J. Biol. Chem.*, **82**, 273.
Bloor, W. R. and Snider, R. H. (1934): *J. Biol. Chem.*, **107**, 459.
Boyd, E. M. (1936): *J. Biol. Chem.*, **114**, 223; **115**, 37.
Fiske, C. H. and Subbarow, Y. (1925): *J. Biol. Chem.*, **66**, 375.
Kelsey, F. E. (1939): *J. Biol. Chem.*, **127**, 15.
Kumagawa, M. and Suto, K. (1908): *Biochem. Z.*, **8**, 212.
Man, E. B. and Gildea, E. F. (1932-33): *J. Biol. Chem.*, **99**, 43.
Man, E. B. and Gildea, E. F. (1937): *J. Biol. Chem.*, **122**, 77.
McEwen, H. D. cf. Kelsey, F. E. (1939).

- Page, I. H., Kirk, E. et al. (1935): J. Biol. Chem., **111**, 613.
 Stewart, C. P. and Hendry, E. B. (1935): Biochem. J., **25**, 1683.
 Stoddard, J. L. and Drury, P. E. (1929): J. Biol. Chem., **84**, 741.
 Thanhauser, S. J. and Setz, P. (1936): J. Biol. Chem., **116**, 533.
 Tisdall, F. F. (1922): J. Biol. Chem., **50**, 329.
 Yasuda, M. (1931): J. Biol. Chem., **92**, 303.
 „ (1931-32): J. Biol. Chem., **94**, 401.
 „ (1936): J. Biochem., **24**, 429.
 „ (1937-a): J. Biochem., **25**, 417.
 „ (1937-b): J. Biochem., **26**, 203.



BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

LIII. Glucosamine as a Glycogenetic Substance in Organisms.

By

MASATO YOSITAKE.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, August 21, 1939)

Masai and Nakamura (1926) found an excretion of lactic acid in the urine and glycogen synthesis in the liver when they administered glucosamine hydrochloride to dogs, and advanced the suggestion that glucosamine is desaminated into glucose in the organism. Later on, Kawabe¹⁾ (1934), one of our collaborators, secured similar data on rabbits and affirmed, as well, the formation of glucose; but, as to the chemical mechanism, he expressed a different claim, based on the quantitative behaviour of nitrogenous compounds in urine. According to him, glucosamine is at first split up into two 3-C compounds, one containing N and the other free of N, and, from the latter is formed lactic acid, which, in turn, is synthesized into glucose and glycogen. However, it is not considered settled by their observations that glucosamine is glycogenetic, because neither the excreted lactic acid nor the increased glycogen was demonstrated to have been produced at the expense of the aminosugar transferred. According to the investigations of Zummo, the oxygen consumption of animals is reduced markedly by glucosamine, no matter whether the aminosugar be given per os or parenterally. If so, the findings of Masai and Nakamura as well as of Kawabe may be due to the oxidation disturbance of carbohydrates pre-existent in the animal body.

It is generally considered that to decide most convincingly

1) A comprehensive review of the literature was made by him.

whether or not a compound is glycogenetic, are best to employ. Baumgarten (1906) made a few experiments with the hydrochloride of glucosamine on diabetic patients and pancreas-diabetic dogs but unfortunately he did not try to see if extraglucose was excreted or not. Subsequently, Forschbach transferred carbonic ester of the aminosugar to depancreatized dogs orally and Meyer gave acetylglucosamine in a similar manner to phlorhizinized rabbits. Extraglucose appeared in urine in neither of these cases, and both experimenters said that the respective N-derivatives are readily assimilated in the organism by a chemical process that yields no glucose. Concerning the acetyl derivative this assertion does not seem acceptable to the writer, as Watanabe recently disclosed in our institute that it is hardly absorbable from the digestive tract and is furthermore extremely resistant to chemical change by tissues.

In the present work, glucosamine hydrochloride was administered to phlorhizinized rabbits. The estimation of excreted glucosamine was made by the writer's method, which has already been reported in this journal, and the glucose co-present in urine was calculated out from the total reducing force less the corresponding force of the glucosamine. Forschbach and Meyer made use of the fermentation process for the determination of glucose, which is not so expedient and takes time.

EXPERIMENTAL.

1. *Methods.*

Male rabbits, which had been fed on bean curd refuse, were used. Phlorhizin was dissolved in a 1.2% sodium carbonate solution in the proportion of 1 gm. in 20 cc. and injected subcutaneously two or three times a day at equal intervals, as Lusk recommended. Glucosamine hydrochloride was given to some animals per os in the form of pills with a few drops of water and to others as with NaOH neutralized solution either enterally or subcutaneously. During the experiment, no food was given but water, except when otherwise mentioned. A day's urine was collected in the morning

by means of a Nelaton's catheter, the bladder was then washed and the urine and the washings were combined together for analysis, which was made by the following methods:

(1) *Nitrogen: By the Kjeldahl method.*

(2) *Reducing force: By the Fujii and Akutsu modification of the Benedict method.*

20 cc. of the Fujii and Akutsu reagent were found to be reduced by 18.81 mg of glucosamine. Experimental figures obtained by titrating the reagent with solutions of glucosamine hydrochloride are listed in the accompanying table (Table I). 22.70 mg of the hydrochloride correspond to 18.81 mg of the aminosugar as a free base.

The reducing force of phlorhizin was infinitesimal.

TABLE I.

Quantities of glucosamine hydrochloride required to reduce 20 cc of Fujii and Akutsu's copper solution.

Conc. of glucosamine hydrochloride in solutions applied gm/dl	Quantities of the solutions required cc	Quantities of glucosamine hydrochloride required mg
0.5	4.55	22.75
	4.60	23.00
	4.55	22.75
	4.60	23.00
0.4	5.70	22.80
	5.70	22.80
0.3	7.60	22.80
	7.70	23.10
	7.60	22.80
0.2	11.00	22.00
	11.10	22.20
	11.20	22.40
		Average: 22.70

(3) *Glucosamine: By the writer's method.*

(4) *Removal of glucosamine, phlorhizin and amino acids from urine.*

Neutralized urine (20 cc.) was subjected to lead treatment and to ultrafiltration, as described in the communication on glucosamine analysis. After extraction with ether, the solution was treated with mercuric acetate and NaOH at first, and afterwards with mercuric oxide, followed by removal of the mercury with H₂S and extraction with ether, according to Masamune and Tanabe.

Normal rabbit urine did not rotate a D-light after these operations. Phlorhizin added in advance (to the concentration of 0.2%) was removed entirely, while all of the glucose similarly added was recovered in the final liquid.

A further proof of the adequacy of the procedure are the examples given in Table VI and VII (5th per., 5-7th col.) showing that the reducing force—of a phlorhizindiabetic urine—before the application of the procedure, and the reducing force and rotatory power after it coincided well as glucose.

2. *Data of Animal Experiments.*

Embodied in Table II-IX.

For D to calculate the ratio:

$$\frac{D}{\text{Total N-glucosamine—N administered}},$$

the figures put in parentheses in the 5th columns were used.

DISCUSSION.

The D:N ratio was raised, without exception, on the administration of glucosamine. To begin with, it is a fundamental problem whether or not the excess of reducing force is to be ascribed to glucose. It is seen in the 5 to 7th columns of Exp. 3-6 that the remaining rotatory power and reducing force after removal of glucosamine, phlorhizin and amino acids coincided fairly well in each case, not only with each other as glucose but also with the reducing force of the urine less the corresponding force of glucos-

TABLE II. Exp. I.
Rabbit No. I. ♂

Period ¹⁾	Date 1938, Dec.	Body- weight gm	Urine vol. cc.	Reducing force as glucose gm	Glucos- amine gm	Total N gm	$\frac{D}{\text{Total N, D}}$ and $\frac{\text{Total N—}}{\text{Total N—}}$ glucosamine-N administered	Remarks.
I	23-24							Fasting. Water taken 35 cc.
II	24-25	2640	109	4.8837		1.3745	3.56	Phlorhizin inj. subc. ⁵⁾ Water given, 50 cc.
III	25-26	2550	105	4.6512		1.7990	2.58	" " " "
IV	26-27	2490	88	3.5038		1.3930	2.58	" " " "
V	27-28	2450	108	4.2553		1.6450	2.58	" " " "
VI	28-29	2420	137	4.2105 (3.8676) ²⁾	0.3223	1.4140 (0.9473) ³⁾	2.78 ⁴⁾	Phlorhizin inj. subc. ⁵⁾ Water given, 50 cc. 7.2 gm. of glucosamine hydrochloride (3 gm per kg of bodyweight) in 30 cc of water (neutralized) were transferred p.o. at 9:00 a.m. on the 28th.
VII	29-30	2280	137	3.2727	0.0	1.3240	2.48	No diarrhea Phlorhizin inj. subc. ⁵⁾ Water given, 50 cc.

1) Each period began at 9:00 a.m. and ended at 9:00 a.m. on the following day.

2) In parenthesis is given the value obtained by subtracting the reducing force corresponding to the excreted glucosamine from the total.

3) The figure in parenthesis is the nitrogen in the total less the amount involved in glucosamine administered.
4) The ratio of D to the total N minus N of glucosamine excreted as such. The other figures in this column are all D/Total N.

5) 2 gm of phlorhizin were injected in two portions, the first at 9:00 a.m. and the second at 9:00 p.m. on the first day of each period.

TABLE III. Exp. 2.
Rabbit No. 2. ♂

Period ¹⁾	Date 1938, Dec.	Body- weight gm	Urine vol. cc.	Reducing force as glucose gm	Glucos- amine gm	Total N gm	$\frac{D}{\text{Total N, } D}$ $\frac{\text{Total N—}}{\text{glucosamine-N}}$ administered	Remarks.
I	23-24							Fasting. Water taken 25 cc.
II	24-25	2850	85	3.0769		1.0500	2.93	Phlorhizin inj. subc. ⁵⁾ Water given, 50 cc.
III	25-26	2800	165	2.5862		1.1813	2.19	" ⁵⁾ "
IV	26-27	2770	156	2.8986		1.2950	2.23	" ⁵⁾ "
V	27-28	2760	187	3.8710 (3.7242) ²⁾	0.1381	1.3440 (0.9876) ³⁾	2.80 ⁴⁾	Phlorhizin inj. subc. ⁵⁾ Water given, 50 cc. 5.5 gm of glucosamine hydrochloride (2 gm per kg of bodyweight) in 30 cc of water (neutralized) were transferred p.o. at 9:00 a.m. on the 27th.
VI	28-29	2700	146	2.6270	0.0	1.1410	2.30	No diarrhea Phlorhizin inj. subc. ⁵⁾ Water given, 50 cc.

1)-5) Same as in Exp. 1.

TABLE IV. Exp. 3.
Rabbit No. 3. ♂

Period ^a	Date 1939, Jan.	Bodyweight gm	Urine vol. cc	Reducing force as glucose gm	After removal of glucosamine, phlorhizin and amino acids			Glucosamine gm	Total N gm	D and Total N—glucosamine-N administered		Remarks
					Reducing force as glucose gm	Rotatory power as glucose gm				D	Total N	
I	7-8	2650	40						0.7952			Fasting. Water taken, 30 cc.
II	8-9	2600	30						0.7203			" " " 25 cc.
III	9-10	2580	89	3.2258					1.2460	2.58		Phlorhizin inj. subc. ^b Water given, 50 cc.
IV	10-11	2500	97	3.9111					1.5785	2.47		" " " "
V	11-12	2470	88	3.7500					1.5225	2.47		" " " "
VI	12-13	2370	150	5.0000 (4.8893) ^c	4.7844	4.6252	0.1036		1.4875 (0.1765) ^b	3.30 ^d		Phlorhizin inj. subc. ^b Water given, 50 cc. 4.8 gm of glucosamine hydrochloride (2 gm per kg of bodyweight) was ingested in the form of pill, at 9:00 a.m. on the 12th.
VII	13-14	2300	69	2.400			0.0		0.8344	2.88		No diarrhea Phlorhizin inj. subc. ^b Water given, 50 cc.

1)-5) Same as in Exp. 1.

TABLE V. Exp. 4.
Rabbit No. 4, ♂

Period ¹⁾	Date 1939, Jan.	Bodyweight gm	Urine vol. cc	Reducing force as glucose gm	After removal of glucosamine, phlorhizin and amino acids			Glucosamine gm	Total N gm	$\frac{D}{\text{Total N}}$ and $\frac{D}{\text{Total N}-\text{glucosamine-N}}$ administered	Remarks
I	7- 8	2670	47		Reducing force as glucose gm	Rotatory power as glucose gm			0.6993		Fasting. Water taken, 25 cc.
II	8- 9	2620	40						0.5355		" " 30 cc.
III	9-10	2570	29						0.7504		" " "
IV	10-11	2540	128	5.4348					1.4263	3.80	Phlorhizin inj. subc. ²⁾ Water given, 50 cc.
V	11-12	2480	216	5.9574					1.8620	3.20	" " "
VI	12-13	2120	235	5.4545					1.7500	3.11	" " "
VII	13-14	2080	137	4.3636 (3.6587) ²⁾	3.7375	3.7382	0.6630	0.7665 (0.4943) ³⁾		5.66 ⁴⁾	Phlorhizin inj. subc. ⁵⁾ Water given, 50 cc. 4.2 gm of glucosamine hydrochloride (2 gm. p.kg. of bodyweight) were ingested in the form of pill at 9:00 a.m. on the 13th.
VIII	14-15										No diarrhea Died.

1)-5) Same as in Exp. 1.

TABLE VI. Exp. 5.
Rabbit No. 5. ♂

Period ^b	Date 1939, Jan.	Bodyweight gm	Urine vol. cc	Reducing force as glucose gm	After removal of phlorhizin and amino acids or of Glucosamine in addition			Glucosamine gm	Total N gm	$\frac{D}{\text{Total N}}$ and $\frac{\text{Total N} - \text{glucosamine-N administered}}{\text{Total N}}$	Remarks
					Reducing force as glucose gm	Rotatory power as glucose gm	Glucose gm				
I	21-22	2600	150						2.2260		500 gm of bean curd refuse were given. ^{a)}
II	22-23	2420	150						2.2624		Fasting. Water taken, 35 cc.
III	23-24	2320	215	8.3333					2.2008	3.79	Phlorhizin inj. subc. ^{a)} Water given, 30 cc.
IV	24-25	2200	178	8.9286					2.3560	3.13	" " " "
V	25-26	2070	178	8.8889	8.8800	8.8797			2.8812	3.09	" " " "
VI	26-27	1950	176	10.0000 (9.8150) ²⁾	9.8667	9.7682	0.1740		2.5998 (2.3406) ³⁾	3.85 ⁴⁾	Phlorhizin inj. subc. ^{a)} No water was given. 4 gm of glucosamine hydrochloride (2 gm per kg of bodyweight) in 30 cc. of water (neutralized) were transferred p.o. at 7:00 a.m. on the 26th.
VII	27-28	1850	170	6.9767			0.0		2.2512	3.10	No diarrhea Phlorhizin inj. subc. ^{a)} Water given, 30 cc.

- 1) Each period began at 7:00 a.m. and ended at 7:00 a.m. on the following day.
2), 3) and 4) Same as in Exp. I.
5) The animal had been fed daily on 500 gm of bean curd refuse for longer than a week before the commencement of the experiment.
6) 3 gm of phlorhizin were injected in three portions, the first at 7:00 a.m., the second at 3:00 p.m. and the third at 11:00 p.m. on the first day of each period.

TABLE VII. Exp. 6.

Rabbit No. 6. ♂

Period ¹⁾	Date 1939, Jan.	Bodyweight gm	Urine vol. cc	Reducing force as glucose gm	Reducing force as glucose gm	Rotatory power as glucose gm	Glucosamine gm	Total N gm	$\frac{\text{D}}{\text{Total N}}$ and $\frac{\text{D}}{\text{Total N}-\text{glucosamine-N administered}}$	Remarks
I	21-22	2350	187					2.4696		500 gm of bean curd refuse were given. ²⁾
II	22-23	2250	98					1.5736		Fasting. Water taken, 25 cc.
III	23-24	2180	136	4.8077				1.1130	4.33	Phlorhizin inj. subc. ³⁾ Water given, 30 cc.
IV	24-25	2070	158	3.6145				1.2768	2.82	" " " "
V	25-26	1970	175	4.2105	4.2968	4.3130		1.5456	2.72	" " " "
VI	26-27	1870	140	4.0000 (3.7798) ²⁾	3.8276	3.8031	0.2071	1.3090 (1.0628) ³⁾	2.93 ⁴⁾	Phlorhizin inj. subc. ³⁾ No water was given. 3.8 gm of glucosamine hydrochloride (2 gm per kg of bodyweight) in 30 cc. of water (neutralized) were transferred p.o. at 7:00 a.m. on the 26th.
VII	27-28	1780	109	1.8000			0.0	0.7056	2.54	No diarrhea Phlorhizin inj. subc. ³⁾ Water given, 30 cc.

1)-6) Same as in Exp. 5.

The animal died on the 29th from general debility.

TABLE VIII. Exp. 7. (Control experiment with glucose).
Rabbit No. 7. ♂

Period ¹⁾	Date 1939, Feb.	Body- weight gm	Urine vol. cc.	Glucose gm	Total N gm	D Total N	Remarks
I	7- 8	2970	228		3.0660		500 gm of bean curd refuse were given. ²⁾
II	8- 9	2880	109		2.1560		Fasting. Water taken, 50 cc.
III	9-10	2820	115	7.1429	2.0832	3.43	Phlorhizin inj. subc. ³⁾ Water given, 30 cc.
IV	10-11	2720	138	6.2500	2.1952	2.84	" " "
V	11-12	2620	155	5.0000	1.9656	2.54	" " "
VI	12-13	2520	165	5.7692	1.8984	3.04	Phlorhizin inj. subc. ³⁾ No water was given. 4.2 gm of glucose ($2 \times \frac{180}{216}$ gm. per kg. of bodyweight) in 30 cc of water were transferred p.o. at 7:00 a.m. on the 12th.
VII	13-14	2470	70	1.9512	0.7448		No. diarrhea
						2.64	Phlorhizin inj. subc. ³⁾ Water given, 30 cc.

1) 2) and 3) Same as 1) 5) and 6) respectively of Exp. 5.

TABLE IX. Exp. 8 (Control experiment with glucose).

Rabbit No. 8. ♂

Period ¹⁾	Date 1939, Feb.	Body- weight gm	Urine vol. cc.	Glucose gm	Total N gm	D Total N	Remarks
I	7- 8	2600	249		2.7734		500 gm of bean curd refuse were given. ²⁾
II	8- 9	2520	39		0.8526		Fasting. Water taken, 50 cc.
III	9-10	2500	138	3.6486	1.2096	3.05	Phlorhizin inj. subc. ³⁾ Water given, 30 cc.
IV	10-11	2350	115	4.0816	1.7528	2.33	" " "
V	11-12	2250	174	3.1579	1.4028	2.26	" " "
VI	12-13	2160	117	2.7174	0.9830	2.78	Phlorhizin inj. subc. ³⁾ No water was given. 3.7 gm of glucose ($2 \times \frac{180}{216}$ gm per kg of bodyweight) and 0.7 gm of NaCl ⁴⁾ in 30 cc. of water were transferred p.o. at 7:00 a.m. on the 12th.
VII	13-14	2120	88	0.8571	0.3864	2.26	No diarrhea. Phlorhizin inj. subc. ³⁾ Water given, 30 cc.

1)-3) Same as in Exp. 7.

4) Corresponds to the NaCl amount, which would have been contained in the neutralized solution of glucosamine hydrochloride, if the latter had been given in the proportion of 2 gm per kg of bodyweight.

amine contained. Therefore, the reducing substance, which raised the D:N ratio, is regarded actually as glucose.

Kawabe demonstrated that the N of glucosamine administered enterally or subcutaneously is excreted in urine almost entirely in a day. If calculated under the assumption that the excretion was complete, extraglucoase in Exp. 1-6 amounts to 1.4233,¹⁾ 1.5416,²⁾ 1.9833,³⁾ 2.0967,⁴⁾ 2.5357⁵⁾ and 0.867 gm.⁶⁾ For 1 gm. of glucosamine assimilated the quantities come to 0.2394,⁷⁾ 0.3488,⁸⁾ 0.5199,⁹⁾ 0.7441,¹⁰⁾ 0.8073¹¹⁾ and 0.2913 gm.¹²⁾ In the control experiments with glucose (Exp. 7 and 8), only 0.6625¹³⁾ and 0.4565 gm.¹⁴⁾ out of 4 and 3.7 gm. glucose given were eliminated in urine as such. Hence, it is a fact that glucose is produced in the body in an abundance from glucosamine.¹⁵⁾

In accordance with the formation of glucose, the breakdown of protein was markedly depressed by glucosamine. The decreases in output of the endogenous nitrogen from the amounts of the immediately preceding periods were 0.1236,¹⁶⁾ 0.0695,¹⁷⁾ 0.0893,¹⁸⁾ 0.4455,¹⁹⁾ 0.1721²⁰⁾ and 0.1640 gm.²¹⁾ for 1 gm. of the aminosugar

$$1) \quad 3.8676 - (0.9474 \times 2.58) \quad 2) \quad 3.7242 - (0.9876 \times \frac{2.19 + 2.23}{2})$$

$$3)-6) \quad \text{Calc. as in 1) and 2)} \quad 7) \quad \frac{1.4233}{7.2 \times \frac{179}{216} - 0.3223}$$

$$8)-12) \quad \text{Calc. as in 7)} \quad 13) \quad 5.7692 - (1.8984 \times \frac{2.84 + 2.54}{2})$$

14) Calc. as in 1). 15) The amount of extraglucoase excreted after glucosamine administration is not less than that after glucose administration, even when calculation is made by applying the ratio, D/(Total N—glucosamine-N excreted), instead of the ratio, D/(Total N—glucosamine-N administered), namely, when it is assumed that glucosamine excreted as such had been the only compound in urine containing extrogenous nitrogen and the rest of the nitrogen introduced into the body had been deposited in tissues. The values thus computed are 0.0473, 0.1776, 0.3184, 0.5022, 0.5740 and 0.0702 gm for 1 gm of glucosamine assimilated.

$$16) \quad \frac{1.6450 - 0.9474}{7.2 \times \frac{179}{216} - 0.3223} \quad 17)-21) \quad \text{Calculated as in 16). If calculated under}$$

the same assumption as in 15) the figures 16)-21) become 0.0042, <0, 0.0111, 0.0184, 0.0939 and 0.0859. The values are similar to those of 1) and 2) of the following page.

utilized and 0.016¹⁾ and 0.1135 gm.²⁾ for the same quantity of glucose ingested. Because of the fluctuating nitrogen values of urine in the periods prior to the administration of the sugars, accurate numerical information on the relative protein-saving powers of glucosamine and glucose will not be of much value, but at least it may be said from the figures that glucosamine is not superseded by glucose in this connection.

To sum up: 1) glucose is formed from glucosamine in the animal body, whatever the mode of conversion may be; and 2) in diabetes, first, more extraglucose is excreted from the kidney when glucosamine is administered than when glucose is given, and second, the aminosugar depresses the decomposition of protein at least in a similar degree to glucose—probably much less glycogen is deposited from the aminosugar.

In Exp. 4 and 5, extraglucose amounted to much more than half the equivalent of the utilized glucosamine. This conforms apparently with the desamination hypothesis of Masai and Nakamura and not with the conception of Kawabe, because the latter thought that lactic acid was derived only from the non-nitrogenous product in the alleged primary cleavage of glucosamine. However, it is not impossible in severe diabetes that the fragment containing nitrogen is also used for the synthesis of glycogen and glucose. The present data do not suggest any clue to the mechanism of the chemical process.

SUMMARY.

Glucosamine administered to phlorhizinized rabbits caused them to excrete even more extraglucose than did glucose given as such. The formation of glucose from the aminosugar is therefore beyond doubt. But, as to the mode of conversion, the data furnished no proof either for the desamination hypothesis (Masai and Nakamura) or for Kawabe's assertion.

The writer owes much gratitude to Dr. Y. Tanabe for considerable assistance, and to the Foundation for the Promotion of

1) $\frac{1.9656 - 1.8984}{4.2}$

2) Calculated as in 1).

Science and Industrial Research of Japan for a grant which enabled him to undertake this work.

REFERENCES.

- Baumgarten, O. (1906): *Z. exp. Pathol. u. Therap.*, **2**, 53.
 Forschbach, T. (1906): *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.*, **8**, 313.
 Fujii, N. and Akutsu, N. (1937): *J. Biochem.*, **25**, 237.
 Kawabe, K. (1934): *J. Biochem.*, **20**, 293.
 Lusk, G. (1898): *Z. Biol.*, **36**, 82.
 Masai, Y. and Nakamura, K. (1926): *Osaka Igakkai Zasshi*, **26**, 1.
 Masamune, H. and Tanabe, Y. (1938): *J. Biochem.*, **28**, 19.
 Meyer, K. (1907): *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.*, **9**, 134.
 Yositake, M. (1939): *J. Biochem.*, **30**, 199.
 Zummo, C. (1932-33): *Arch. intern. Pharmacodyn. et Therap.*, **44**, 40.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

LIV. Hyperglycemia after Glucosamine Injection and the Mechanism of its Occurrence.

By

MASATO YOSITAKE.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

Received for publication, August 21, 1939)

The foregoing work (Yositake 1939 ii) established that glucose is formed from glucosamine in a phlorhizinized animal. It suggests the occurrence of hyperglycemia in a normal animal, when this aminosugar is administered. Among former investigators, who undertook to bring to light the fate in vivo of glucosamine, some, for example Moschini, gave up the attempt to follow the blood-sugar behaviour because of the deficiency of an appropriate analytical method. As already reported (Yositake 1939, i), the blood-deproteinizing process of Dumazert and Bierry is adequate for removing added aminosugar together with protein, allowing the fermentable sugar to pass into the filtrate completely. This process enabled the writer to find out a few facts which are described in this account.

In preliminary experiments, the reducing force of glucosamine-free blood-filtrate was seen to increase, when aminosugar was injected into rabbits subcutaneously. The rise of reducing force does not always signify the increase of glucose. But affirmative evidence for it was obtained by applying the indole reaction to the Folin filtrates of the blood specimens. The strength of colour developed by the reaction varied from one blood specimen to another with discrepancies just coinciding, expressed as glucose, with those in reducing force.

Then was the excess of glucose produced actually from glucosamine, as the phlorhizin experiments suggested? It may be other-

wise due to a) the stimulation of the nervous center of carbohydrate regulation, b) disturbance of oxidation in carbohydrate metabolism, or c) peripheric acceleration of glycogenolysis by the aminosugar.

The injection of this substance into rabbits, which had undergone double splanchnicotomy, still caused hyperglycemia to a similar extent as before the operation. Therefore the first possibility is excluded. As regards the second possibility, the effect of glucosamine on several oxidases, which partake in oxidation of the end products of carbohydrate metabolism, was examined. But, the aminosugar did not depress the activities of these enzymes at all. Zummo recently observed the lowering of oxygen consumption of animals following the transference of glucosamine. This phenomenon does not seem to have any relation with the hyperglycemia under discussion. Finally the increased glycogenolysis (third possibility) is denied, because Kawabe has already shown that an appreciable amount of glycogen is deposited in the liver of normal rabbits, following a glucosamine injection. After all, it would seem most probable that the rise of blood glucose occurs at the expense of the aminosugar.

Kawabe found a distinct increase of lactic acid in blood. The temporal relationship of its occurrence with the rise of blood sugar is deemed significant. Therefore, the writer followed the quantitative behaviours of these components simultaneously in one experiment. Quite unexpectedly, however, lactic acid did not fluctuate at all, although glucosamine was applied in an amount and manner similar to the experiments of Kawabe. The author made the analysis by the Sudo method which requires a large quantity of blood (20 cc. for one run). Since in the control experiments of Kawabe no rise of lactic acid was observed, anemia and the introduced glucosamine probably aided each other to increase this acid. The details are given below.

EXPERIMENTS AND COMMENTS.

I. Animal experiments.

Grown up rabbits were used. They were fed with bean curd refuse except on the days of experiments.

1) *Hyperglycemia following subcutaneous administration of glucosamine.*

Glucosamine hydrochloride (2 gm. per kg of bodyweight) was transferred either per os, as wrapped in a thin wafer, or subcutaneously, after dissolving in water (6 cc. for 2 gm. of the hydrochloride) and neutralizing with 2*n.* NaOH. Blood was drawn immediately prior to the transference of the aminosugar and thereafter at intervals and glucose was determined by measuring the reducing force on ferricyanide of the Dumazert-Bierry filtrates (cf. Yositake 1939 i).

As is illustrated in the accompanying table (Table I), hyperglycemia occurred when the aminosugar was applied by injection, but not when the substance was ingested, probably due to very gradual absorption.

The hyperglycemia attained its maximum between the second and the third hour after the injection.

The experiment on rabbit No. 3 was made to see if the increase of the reducing force on ferricyanide is ascribable to a real rise of glucose. More than 2 cc. of blood were drawn before the application of glucosamine and at the first, second and third hours after it, and from each of the blood specimens, 1 cc. was taken for the determination of reducing force and 1 cc. from the rest was adapted to the indole reaction of Dische and Popper after removing the protein according to Folin and Wu¹⁾ (blood dilution: 10 times). The figures put in parentheses in the table are the values calculated as glucose from the color strength developed. The Folin and Wu filtrates contain glucose not only in a free state but also in combined forms. Hence, the intensities of their coloration exceeded, as expressed as glucose, the corresponding reducing forces of the Dumazert and Bierry filtrates, but the differences between the values by the indole method after glucosamine injection and that before it were 0.043, 0.054 and 0.048%, and agreed well with those between the corresponding reducing

1) The adequacy of the Folin and Wu filtrate for this analysis was checked by the recovery of glucose added to blood.

TABLE I.
Free blood glucose of rabbits, expressed in per cent, after administration of glucosamine.

Date 1938	Rabbit			Free glucose at various intervals (h), after transference of glucosamine								Remarks		
	No.	Sex	Body- weight gm	0	1/4	1/2	3/4	1	2	3	4		5	7
Apr. 11	1	♂	2100	0.103	0.105	0.118	0.118	0.125	0.135	0.113	0.106			Glucosamine sube inj.
" 13	2	♂	2500	0.085	0.094	0.095		0.102	0.137	0.144	0.137	0.131		"
Jun. 1	3	♂	2180	0.098 (0.125) ¹⁾	0.114	0.127	0.135	0.140 (0.168) ¹⁾	0.151 (0.179) ¹⁾	0.143 (0.173) ¹⁾	0.132	0.116		"
Mar. 31	Control	♂	2310	0.096		0.100		0.103	0.096	0.095	0.096	0.097		1.25 gm. of NaCl in 13.9 cc of water ²⁾ were inj. subc. in place of neutral glucosamine sol.
Apr. 16	4	♀	2475	0.098		0.104		0.102	0.102	0.103	0.103	0.098	0.102	Glucosamine ingested. No diarrhea.
" 19	5	♀	2330	0.101				0.102	0.101	0.100	0.097	0.101	0.098	"
" 24	6	♂	2250	0.089				0.093	0.093	0.095	0.093	0.092	0.087	"

1) Values of glucose obtained by the Dische and D

1) Values of glucose obtained by the Dische and Popper method on the Folin filtrates.

2) Neutral glucosamine solution, which is prepared for injection into a rabbit of equal bodyweight, contains this amount of NaCl in the same concentration.

forces, which were 0.042, 0.053 and 0.045%. This coincidence is assumed as evidence of true hyperglycemia.

2) *Quantitative behaviour of blood glucose in animals, the splanchnic nerves of which are cut.*

Glucosamine was always injected in the dose and manner similar to those in the above experiments. The hyperglycemia of the animals in their normal state was measured for the purpose of an accurate contrast. The nerves were then cut out for about 1 cm on both sides, by way of the abdominal cavity, and, after more than two weeks, the glucosamine experiments were conducted again. The figures in Table II indicate that the hyperglycemia is not influenced by splanchnicotomy, regarding not only its degree but probably also its duration, judging from the gradients of curves plotted therefrom, although the observation was not continued for longer than five hours. The rise in discussion of blood glucose is of peripheric nature.

3) *Lactic acid of the blood was not increased.*

Analysis was carried out by the Mendel-Goldscheider method. Glucosamine was injected, similar in manner and dose as before, into two normal rabbits and the blood glucose was estimated simultaneously with the acid. The data are listed in Table III. While hyperglycemia took place, lactic acid remained nearly unchanged.

II. Tissue Experiments.

The action of glucosamine on succinodehydrogenase, aldehyde dehydrase and lactic-acid-dehydrase was tested by the methylene blue method of Thunberg. The reaction was always carried out at 38°C.

1) *Effect on succinodehydrogenase.*

Fresh bull muscle was freed from connective tissue, minced and shaken with three times its weight of distilled water saturated with toluenè, for 20 minutes. The tissue was pressed out on

TABLE II.
Effect of double splachnicotomy on hyperglycemia induced by glucosamine injection.

Rabbit		Glucosamine experiment									
No.	Sex	Date of splanch- nicotomy 1938	Date 1938	Body- weight gm	Blood glucose in per cent, at various intervals (h) after injection of glucosamine						
					0	$\frac{1}{2}$	1	2	3	4	5
7	♂	Sept. 17	Sept. 14	2325	0.095		0.119	0.125	0.140 (+47%)	0.126	0.114
			Oct. 7	1900	0.102	0.117	0.124	0.140	0.150 (+47%)	0.134	0.123
8	♂	Sept. 17	Sept. 15	2700	0.094		0.116	0.146 (+55%)	0.140	0.132	0.117
			Oct. 4	2220	0.107	0.120	0.129	0.142	0.151 (+41%)	0.141	0.134
9	♂	Sept. 17	Sept. 16	2355	0.091		0.100	0.112	0.118 (+30%)	0.109	0.101
			Oct. 6	2175	0.095	0.101	0.103	0.107	0.115	0.118 (+24%)	0.108

TABLE III.
Quantitative observation of lactic acid in blood, after subcutaneous injection of glucosamine.
(The amounts of lactic acid and glucose in blood are expressed in per cent.)

Date 1938, Sept.	Rabbit			Analysis	Hours after injection of glucosamine					
	No.	Sex	Body- weight gm		0	1	2	3	4	5
11	10	♂	2438	Lactic acid in blood	0.039	0.038	0.037 (-5%)	0.037	0.037	0.038
				Blood glucose	0.103	0.133	0.156	0.157	0.137	0.133
24	11	♂	2300	Lactic acid in blood	0.029	0.029	0.032 (+10%)	0.032	0.031	0.028
				Blood glucose	0.096	0.110	0.141	0.147	0.128	0.109

cotton gauze. The washing was repeated twice in a similar manner. The reaction mixtures were composed, in the first run, as follows:

Tube No.	I ₁	II ₁	III ₁	IV ₁
Washed muscle (gm.)	0.2	0.2	0.2	0.2
M/15 Phosphate buffer, Sörensen, at pH 7.0 (cc)	0.5	0.5	0.5	0.5
M/25 Neutral solution of glucosamine ¹⁾ (cc)			0.5	0.5
M/25 Neutral solution of succinic acid ²⁾ (cc)		0.5		0.5
0.02% Methylene blue solution (cc)	0.2	0.2	0.2	0.2
Water (cc)	1.0	0.5	0.5	

- 1) 2) Made by dissolving glucosamine hydrochloride or succinic acid in water, then neutralizing with NaOH and ultimately filling up to the concentration of 1/25 molarity. 1) was always prepared immediately before use.

The second run was carried out by taking the tissue from a different bull. The corresponding mixtures (I₂–IV₂) were similarly composed, except that 0.3 gm. of washed muscle was used instead of 0.2 gm.

The results:

Tube No.	I ₁	II ₁	III ₁	IV ₁	I ₂	II ₂	III ₂	IV ₂
Time required for decolorizing methylene blue (min.)	∞	11	∞	11	82	15½	84	14

2) Effect on lactic-acid-dehydrase.

A hog heart as fresh as possible was ground, shaken with 20 volumes of *m*/15 phosphate buffer at pH 7.38 for 10 minutes. Water was squeezed out. The residue was similarly washed once more. The mixtures were made up of the following ingredients:

The first run :

Tube No.	I ₁	II ₁	III ₁	IV ₁	II ₁ '	III ₁ '	IV ₁ '
Heart muscle washed (gm)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
M/15 Phosphate buffer, Sørensen, at pH 7.0 (cc)	2	2	2	2	2	2	2
Neutral solution of glucosamine (cc) $\left\{ \begin{array}{l} M/25 \\ M/5 \end{array} \right.$			1	1		1	1
Solution of lithium lactate (Schuchhardt, Görlitz) (cc) $\left\{ \begin{array}{l} M/25 \\ M/5 \end{array} \right.$		1		1	1		1
0.02% Methylene blue solution (cc)	1	1	1	1	1	1	1
Water (cc)	2	1	1		1	1	

The second run was carried out with the heart of a different hog. The mixtures I₂–IV₂ in this run were respectively composed as I₁–IV₁.

The results:

Tube No.	I ₁	II ₁	III ₁	IV ₁	II ₁ '	III ₁ '	IV ₁ '	I ₂	II ₂	III ₂	IV ₂
Time required for decolorizing methylene blue (min.)	∞	66	∞	64	12	∞	12	∞	33	∞	36

3) Effect on aldehyde.

The liver of a bull, freed from adherent tissue, was cut with scissors into particles of pea size, and washed under running water (5°C.), in cotton gauze, for 1 hour. It was then ground and shaken with 2 volumes of water added with a little toluene for 2 hours, followed by centrifuging. The supernatant liquid was precipitated with 3 volumes of acetone and the deposit was separated by centrifuging, washed twice with ether and finally dried in vacuo over sulfuric acid. The compositions of the reaction

mixtures were the following:

Tube No.	I ₁ , I ₂	II ₁ , II ₂	III ₁ , III ₂	IV ₁ , IV ₂
Liver powder ¹⁾ (mg)	30	30	30	30
M/15 Phosphate buffer Sørensen, at pH 7.17 (cc)	2	2	2	2
M/25 Neutral solution of glucosamine (cc)			1	1
M/25 Acetaldehyde solution (cc)		1		1
0.02% Methylene blue solution (cc)	1	1	1	1
Water (cc)	2	1	1	

1) Contained no alcoholdehydrogenase.

I₁-IV₁ were the tubes of the first run, and I₂-IV₂ were those of the second run. The two runs were performed with liver powder from different bulls.

The results:

Tube No.	I ₁	II ₁	III ₁	IV ₁	I ₂	II ₂	III ₂	IV ₂
Time required for decolorizing methylene blue (min.)	∞	13	∞	12	∞	20	∞	20

Glucosamine was thus seen to exert no influence on any of these dehydrogenases.

SUMMARY.

Glucosamine causes hyperglycemia of peripheric nature in rabbits. This aminosugar does not affect the activities of the oxydases which participate in the oxydation of final products of carbohydrate metabolism. Most likely the hyperglycemia is due to the accumulation of glucose, either derived from the administered glucosamine or produced from the cleavage product or products of this aminosugar.

The writer is indebted to the Foundation for the Promotion of Science and Industrial Research of Japan for a grant, which enabled him to carry out this work.

REFERENCES.

- Dische, Z. u. Popper, H. (1929): *Biochem. Zeits.*, **175**, 371.
Kawabe, K. (1934): *Journ. of Biochem.*, **20**, 293.
Mendel, B. u. Goldscheider, I. (1925, 1928): *Biochem. Zeits.*, **164**, 163; **202**, 390.
Moschini, A. (1924–25): *Arch. ital. de Biol.*, **74**, 117.
Yositake, M. (1939, i): *Journ. of Biochem.*, **29**, 459.
Yositake, M. (1939, ii): *Journ. of Biochem.*, **30**, 423.
Zummo, C. (1932–33): *Arch. intern. de Pharmacodyn. et de Therap.*, **44**, 40.



BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

LV. Urine Mucoid.

By

TADASI KOBAYASI.

*(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)*

(Received for publication, August 21, 1939)

K. A. H. Mörner described two kinds of urine mucoids, one, "die durch Essigsäure gefällte Musinsubstanz" (das typische Harmucoid) ($[\alpha]_D=62-67.1^\circ$) and the other, "die in Wasser lösliche Mucinsubstanz" ($[\alpha]_D=59.2^\circ$), which is acid soluble, and supposed that the latter is a product artificially derived from the former by a slight change, due to the preparation procedures because they resembled each other in elemental composition as well as in protein reactions.

However, during the preparation of these mucoids according to Mörner, the writer noticed facts suggesting their perfect identity. When a comparatively concentrated solution of the so-called water-soluble mucoid, for instance a 3.5% solution, was acidified with acetic acid (30%) to pH 4.0, no flocculation occurred, but on dilution with 5 volumes of water, bulky precipitates came out, notwithstanding that the hydrogen number was scarcely changed. Since it was a quite unexpected finding, the fraction remaining in solution was separated with alcohol and, after washing with alcohol and ether and drying, was dissolved in a high concentration, acidified and diluted with water similar to the above, whereupon gelatinous precipitates appeared again. The results led the writer to repeat the procedures and finally nearly all of the acid soluble mucoid of Mörner was secured as an acid insoluble substance. In another experiment, a dilute solution (0.1%) was made from the beginning, and submitted to the chloroform treatment by which Mörner prepared the so-called acid-insoluble

mucoid. The substance was deposited also in this case, though in part as a thin film. Probably, there is present in urine one mucoid, the solubility of which depends enormously upon its salt content and "die in Wasser lösliche Musinsubstanz" is nothing but the portion which is held by salts in solution even when the acidified solution is shaken, as was done by Mörner, with chloroform—a precipitation facilitating agent. Chloroform, however, has recently been often employed to cleave off the protein portion from the prosthetic group of glycoproteins. Analysis of Mörner's mucin substances on the carbohydrate components must be, then, an important clue in determining their identity. As will be seen in the experimental part, the specimens separated from one and the same sample of urine not only coincided fairly well in this respect, but also agreed, when their solutions were adjusted to the same hydrogen number, in specific rotation as well as in specific refraction. In the sense that only one single mucoid is separable from urine, the writer names it "urinomucoid" in order to distinguish it from its Mörner fractions, and recommends a more simple preparation method: (1) urine nubecula is dissolved in water with the aid of ammonia and freed from uric acid by passing CO_2 -gas through it, as described by Mörner; (2) the solution is then dialysed three days, evaporated in vacuo at low temperature to a small volume and the mucoid is precipitated with alcohol; (3) purification is carried out twice by dissolving the substance in water, or in water with a little ammonia and reprecipitating with alcohol, and the substance is washed with alcohol and ether, followed by drying in vacuo over phosphorus pentaoxide.

Five specimens of the mucoid prepared in this way contained 11.54–13.39% nitrogen.¹⁾ They contained an aminosugar, acetyl and an ordinary sugar. The ordinary sugar was demonstrated to be galactose by the analytical procedures of Masamune and Tanabe. Mucic acid was further isolated after oxidation with

1) By the micro-Kjeldahl method. Mörner found, by the Frankland-Klingemann method, 12.56–13.01% nitrogen in the preparations of his acid-precipitable mucin substance, calculated on an ash free basis, and 12.57–13.09% nitrogen in those collected as the so-called water-soluble mucoid.

nitric acid. The aminosugar could be identified with glucosamine as its pentabenzoate. Glucosamine, acetyl and galactose were present in the equivalent ratio of 1:1:1. The prosthetic group was separated in a nearly pure state by alkaline treatment. Its $[\alpha]_D$ was -8.48° at 18°C .

EXPERIMENTS.

1. An average of 12 gm. of urine nubecula, as dried, was collected by means of chloroform, per 100 liters of urine.

2. Composition, in particular, as regards the carbohydrate portion and physical constants of Mörner's fractions of the urine mucoid:

Preparation was started with 5 gm. of the dried nubecula. By the procedures of Mörner, 250 mg of the so-called acid precipitable mucin substance and 630 mg of the water-soluble substance were yielded, after purification. Phosphorus and uric acid were not detected in the preparations.

Analysis by the procedures which were employed in this series of investigation gave the following figures:

Analyses	Nitrogen (%)	Carbohydrate reduction as glucose (%)	Aminosugar as glucosamine (%)	Acetyl (%)	Ordinary sugar as galactose (%)	Ash (%)
"Die durch Essigsäure gefällte Mucinsubstanz"	12.18	19.86	10.11	2.52	10.12	1.25
"Die in Wasser lösliche Mucinsubstanz"	12.81	21.70	11.20	2.55	10.07	2.66

Specific optical rotation and refraction:

The fractions were each dissolved in water and adjusted to pH 6.8 by means of 0.1*n*. NaOH solution. Temp.: 26°C .

"Die durch Essigsäure gefällte Mucinsubstanz."

$$[\alpha]_D^{26} = \frac{-1.74 \times 3.0891}{0.09 \times 1.0061 \times 1} = -59.39^\circ$$

Specific refraction:

$$\frac{(1.33276)^2 - 1}{(1.33276)^2 + 2} \times \frac{1}{1.0061} \times \frac{100}{3.0} - \frac{(1.32809)^2 - 1}{(1.32809)^2 + 2} \\ \times \frac{1}{0.9971} \times \frac{100 - 3.0}{3.0} = 0.230^\circ$$

“Die in Wasser lösliche Mucinsubstanz.”

$$[\alpha]_D^{26} = \frac{-1.73 \times 3.0883}{0.09 \times 1.0064 \times 1} = -58.97^\circ$$

Specific refraction:

$$\frac{(1.33276)^2 - 1}{(1.33276)^2 + 2} \times \frac{1}{1.0064} \times \frac{100}{3.0} - \frac{(1.32809)^2 - 1}{(1.32809)^2 + 2} \\ \times \frac{1}{0.9971} \times \frac{100 - 3.0}{3.0} = 0.230^\circ$$

3. “Urinomucoid.”

i) *Preparation and analysis.*

It was prepared as noted above. Yield from 10 gm. of nubecula was 3.5 gm. on the average. Five specimens were prepared and analysis was made, concerning the carbohydrate components in the main as in 2). The values obtained were the following:

N: 11.54–13.39% (mean: 12.39%)

Carbohydrate reduction, as glucose: 19.2–21.6% (mean: 20.1%)

Glucosamine: 9.59–11.25% (mean: 10.13%)

Acetyl: 2.48–2.50% (mean: 2.51%)

Sulfate-sulfur: 0.11–0.13% (mean: 0.12%)

Galactose: 9.86–10.16% (mean: 10.08%)

The equivalent ratio of the mean values of glucosamine, acetyl and galactose is 1.0:1.03:0.99.

The substance gave colour with Ehrlich's reagent of dimethylaminobenzaldehyde, after having been heated with alkali, as well as without this preliminary treatment (Blix). It was free from phosphorus and uric acid. Neither the naphthoresorcinol test nor the aniline reaction for uronic acid was given. The presence of uronic acid was further denied: 1) furfural production¹⁾ amounted only to less than 2%, calculated as glucuronic acid, which is the

1) Estimated by the Tanabe method.

quantity obtainable also from the protein part and from the above kinds of sugars; and 2) the carbohydrate reduction of the mucoid did not exceed the sum of the corresponding powers of the aminosugar and the ordinary sugar. Acid-hydrolysable sulfur was so minute that it was regarded as an impurity.

The ordinary sugar was identified as galactose by the first procedures of Masamune and Tanabe's method. To give an example,¹⁾ 1 cc. of the final solution which had been obtained after hydrolysis²⁾ and fractionation with mercuric acetate and oxide, corresponded to 2.15 mg of the substance, and the colorimetric readings and the reducing force, expressed as galactose, coincided well, as will be illustrated below.

Reaction	Reading mm.	Conc. (%) of sugar in the final solution, calc. as			
		Glucose	Mannose	Galactose	Fructose
Orcinol	8.96	0.0328	0.0278	0.0215	>0.0500
Indole	13.0	0.0155	0.0233	0.0210	0.0098
Diphenylamine I	15.56	0.0123	0.0108	0.0213	—
Reducing force		0.0172	0.0175	0.0212 0.0213(mean)	0.0139

The mean concentration (0.0213%) of galactose in the solution amounts to 9.86%, when computed to the urinomucoid taken.

ii) *Formation of mucic acid from the ordinary sugar.*

2 gm. of an urinomucoid specimen were sealed with 60 cc. of 1 n. H_2SO_4 solution in a tube and heated in a boiling bath for 5 hours. The solution was cooled and sulfuric acid was precipitated with an equivalent quantity of saturated $\text{Ba}(\text{OH})_2$ solution. The supernatant liquid, after centrifuging, was added to 30 cc. of 25% mercuric acetate solution, neutralized with saturated $\text{Ba}(\text{OH})_2$ solution and centrifuged again. The supernatant liquid (353 cc.) was shaken with 30 gm. of freshly precipitated mercuric oxide (yellow) overnight, and filtered, and the barium was removed

1) Analysis was started with 60.54 mg of one of the specimens.

2) Carried out with 1 n. H_2SO_4 solution, by heating for 4 hours.

with a just sufficient quantity of 4*n.* H₂SO₄ solution. The clear solution was passed with H₂S-gas and filtered. The filtrate was extracted with ether thoroughly. pH at this stage was 6.2. It was evaporated in vacuo to 8 cc., transferred in a beaker with 2 cc. of water, then 5 cc. of nitric acid (sp. gr. 1.38) was added and concentrated on a bath to about one-third the original volume. On standing, after the addition of 3 cc. of water, characteristic crystals came out. Yield, 44 mg. The product was recrystallized by dissolving in water with the aid of NaOH and precipitating with HCl. It melted at 224°C under browning and gas evolution. No depression of the melting point occurred when it was mixed with mucic acid which had been prepared from galactose (E. Merck).

Elementary analysis (Pregl)¹⁾:

3.059 mg substance: 1.380 mg H₂O; 3.848 mg CO₂.

C₆H₁₀O₈ Calc.: 4.80% H; 34.29% C.

Found: 5.05% H; 34.31% C.

In addition, thalium salt of mucic acid was found to crystallize out in characteristic form, on treatment of the product with thalium nitrate according to the description of van der Haar.

iii) *Identification of aminosugar with glucosamine.*

3 gm. of a preparation of urinomucoid were hydrolyzed and the aminosugar was benzoylated as Hisamura did in order to identify the chondrosamine of chondromucoid.

The product recrystallized from alcohol showed the characteristic needle form of glucosamine pentabenzoate. Yield, after repeating purification three times, was 77.7 mg.

F.P.: 216°C

Nitrogen: 2.02% (Calc: 2.0%).

$$[\alpha]_D^{19} = \frac{0.45 \times 2.9780}{0.0309 \times 0.9809 \times 1} = +44.22^{(2)}$$

iv) *Isolation of the prosthetic group.*

It was tried by alkaline scission from the protein portion as follows:

1) Kindly made by Dr. S. Umezawa of the Chemical Department.

2) Hisamura and Kusuno: +45.06°.

3 gm. of urinomucoid were dissolved in 100 cc. of 2*n*. NaOH solution and placed in the air. As precipitates came out after one day, they were removed by centrifuging and allowed to stand further. After five days from the beginning (maximal room temperature: 26°C), the transparent liquid was neutralized with 4*n*. HCl under cooling, acidulated with acetic acid and dialyzed against running water for one day. pH was brought to about 4.0 with 30% acetic acid and the solution was shaken with one-fourth the volume of chloroform overnight, then the precipitated protein-fragments were centrifuged and the watery layer was separated. The chloroform treatment was repeated, until no more precipitates came out, and the solution was submitted to dialysis. After two days, it¹⁾ was evaporated at reduced pressure to 30 cc., acidified with acetic acid to pH 4.0 and kneaded with 18 gm. of kaolin. The mixture was collected on a Hirsch's funnel and the filtrate,²⁾ which gave no biuret reaction, was precipitated with six volumes of alcohol and a little sodium acetate. The substance that appeared in flocks were washed with alcohol and ether and finally dried in vacuo. Crop of the colorless powder was 146 mg. It was insoluble in methanol and ethanol, soluble in glacial acetic acid

Analyses	In per cent	In equivalents per equivalent weight
Nitrogen	4.08	1.13
Glucosamine	46.13	1.00
Galactose	46.36	1.00
Acetyl	9.62	0.87
Ash	0.78	

and was not precipitated by phosphotungstic acid. It developed colour with Ehrlich's reagent of dimethylaminobenzaldehyde immediately without being heated in advance with 0.1*n*. NaOH solution (Blix). Acid-hydrolysable sulfur was not detected.

1) 240 cc.

2) 12 cc.

Analysis gave the figures in the table of the foregoing page, which prove the high purity of the production.

$$[\alpha]_D^{18} \text{ was } -8.48^\circ \left(= \frac{-0.086 \times 3.0190}{0.0306 \times 1.0015} \right).$$

What was unexplainable was that its reducing force after hydrolysis did not reach the calculated, 86.58% as glucose, as will be seen below. Hydrolysis was carried out with 1*n.* sulfuric acid solution.

Duration of hydrolysis (h)	Reducing force on ferricyanide, expressed as glucose (%)
0	6.23
2	60.18
3	63.65
4	62.35
5	52.17

SUMMARY.

1. The so-called acid-precipitable and water-soluble urine mucoids of Mörner were demonstrated to be identical with each other. The writer names the mucoid, in this sense, "urinomucoid" to distinguish it from the fractions of Mörner.

2. Urinomucoid contains an acetylglucosamine-galactose (1:1) complex as the prosthetic group.

The writer wishes to express his thanks to Foundation for the Promotion of Science and Industrial Research of Japan for a grant to carry out this work.

REFERENCES.

- van der Haar, A. W. (1920): Anleitung zum Nachweis, zur Trennung u. Bestimmung der Monosaccharide u. Aldehydsäuren, Verlag von Gebrüder Bornträger, Berlin, 105.
 Hisamura, H. (1938): Journ. of Biochem., **28**, 217.
 Hisamura, H. and Kusuno, M. (1938): Journ. of Biochem., **27**, 375.
 Mörner, K. A. H. (1895): Skand. Arch. f. Physiol., **4**, 332.

A PHOTOREDUCING SUBSTANCE CONTAINED IN COMMERCIAL CANDIOLIN.

By

THE LATE MOTOMASA TAWARA.

(From the Institute of Medical Chemistry, Kyusyu Imperial University,
Hukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, Sept. 11, 1939)

In the course of study on the dehydrogenase activity in the retina and its relation to light, the author noticed that a certain substance exists in the market preparation of candiolin, which exhibits a strong reducing action toward methylenblue by irradiation in the absence of any other catalytically active substance. Ascorbic acid is assumed to possess such an action, but no evidence of its existence in the candiolin preparation was found. Further study revealed that hexosediphosphoric acid itself lacked this property and that a substance, which resembles the reducton of Euler in several respects, is present as a contamination in the sample and is responsible for the photoactivity. Since candiolin is used widely in biochemical researches the author feels that it is obviously of enough importance to call to the attention of investigators in this line.

EXPERIMENTAL.

1. *Effect of light in the methylenblue decolourization by candiolin.*

Thunberg's tube was used. Into the tube were introduced 0.5 cc. of *M*/5000 methylenblue, 0.5 cc. of *M*/15 phosphate buffer solution (pH 7.4); 1.0 cc. of redistilled water and 0.5 cc. of *M*/10 candiolin (Natrium salt). After evacuating for 2 minutes at the pressure of 4 mm. of mercury by means of the Gaede's vacuum pump, the tube was immersed in the thermostat kept at 37°C and irradiated with a Matsuda photographic lamp (450 W) at a

distance of 25 cm, and another was kept in darkness as control. The results of a few typical experiments are shown in Table I.

TABLE I.
Effect of light on the methylenblue decolourization by candiolin.

	Decolourization time	
	Irradiation	Darkness
No. 1	25' 0"	> 180'
No. 2	25' 30"	> 720'
Average	25' 15"	> 180'

From the above results, it is clear that the market preparation of candiolin reduces methylenblue by irradiation.

2. *The effect of light on the redox-potential of candiolin.*

To check the above results the redox-potential of the same reaction mixture was measured and the effect of light upon it was examined.

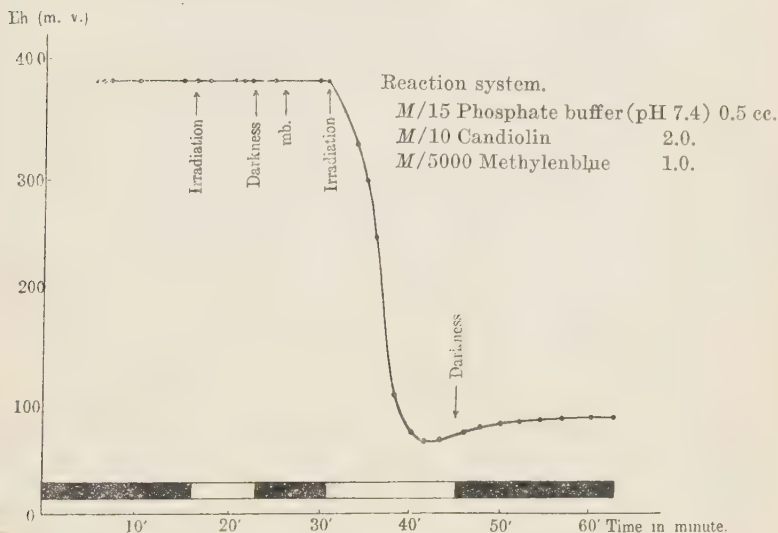
The measurement was made in a dark chamber. For the determination of the potential the unipivot potentiometer of the Cambridge Instrument Co. was used. The electrode was made of platinum. As a reference electrode, a saturated calomel cell was used, which was connected with the reaction vessel with an agar salt bridge. The result is illustrated in Fig. 1.

As Fig. 1 shows, it is obvious that methylenblue alone does not cause any appreciable change of the potential of candiolin, but a remarkable drop of potential is noted when the (mb.+candiolin) system is irradiated with light. This result is completely in accord with that of the foregoing experiment 1.

3. *Experiment on the purified candiolin.*

In order to determine whether the photoactive property of the candiolin preparation used above is due to the hexosediphos-

Fig. 1. The effect of light on the redox-potential of candiolin.
(37°C air temperature).



phoric acid or to other impurities, a similar experiment was carried out with purified candiolin. The purification was done after the method of Neuberg and Sabetays (1925). Purified candiolin is almost colourless, while the market preparation has a yellow-reddish tint. It was used as Na or Mg-salt, the test being carried out in the same manner as the experiment 1. The results are shown in Table II.

TABLE II.

Comparison of the decolourization time of methyleneblue by crude candiolin and by purified candiolin.

	Decolourization time in minutes.		
	Purified candiolin	Crude candiolin	Washed candiolin
No. 1	90'	3' 0"	3' 0"
No. 2	90'	3' 0"	3' 10"
Average	90'	3' 0"	3' 5"

4. On the chemical nature of the photoactive substance.

According to Martini the reducing power of ascorbic acid is augmented by irradiation, thus methylenblue, eosin, benzoflavin and neutral red are promptly decolourized at pH 4.0 and 7.0. It was, therefore, tested whether or not the active agent in the candiolin preparation is identical with ascorbic acid. But all tests suggest that it is not, as the substance in candiolin is heat stable (Table III), can not reduce 2-6-dichlorophenolindophenol and is negative toward Fujita-Ebihara's (1933) colour test of ascorbic acid.

TABLE III.

Resistance of the photoactive substance in candiolin to heating.

	Heating minutes	0'	10'	30'	60'	180'
Decolouriza- tion time	No. 1	40"	40"	40"	40"	40"
	No. 2	40"	40"	40"	40"	40"
	Average	40"	40"	40"	40"	40"

Another substance which deserves special attention in this line is reducton, described by Euler and Martius (1933). This substance is obtained by the treatment of sugar with diluted alkali and has a strong reducing power even in acidic reaction. Its chemical nature is not yet clarified but is claimed by Martius to be oxymalonic acid aldehyde ($C_3H_4O_3$). Since various chemical properties of reducton seem to resemble the substance in question, the author carried out an experiment to find what effect irradiation does exert upon the reducing power of reducton.

0.5 gm. each of glucose, fructose and galactose were dissolved in 30 cc. of water, alkalised with 10 cc. of $N/10$ NaOH and heated for 5 minutes. Then the solution was brought to pH 7.0 by $N/10$ HCl and made up to 100 cc. with water. The reduction test was done by Thunberg's technique with a reaction mixture of 1.0 cc. of the solution, 1.0 cc. of phosphate buffer solution of pH 7.4, 0.2 cc. of $M/5000$ methylenblue. The results are indicated in Table IV.

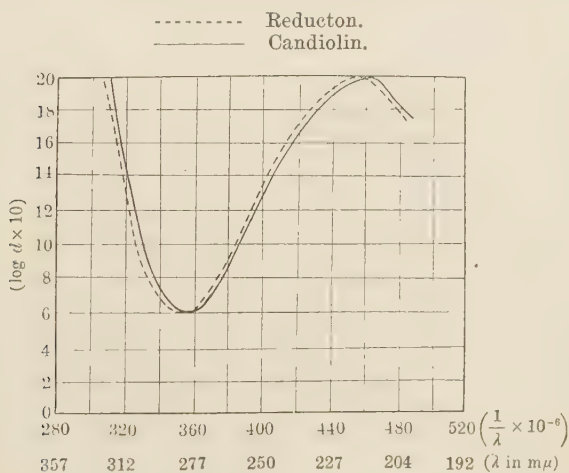
TABLE IV.
Decolourization time of methylenblue by reducton.

		Glucose	Lävulose	Galactose
Reaction system	M/5000 Methyleneblue	0.2	0.2	0.2
	Phosphate buffer (pH 7.4)	1.0	1.0	1.0
	Glucose	1.0	—	—
	Lävulose	—	1.0	—
	Galactose	—	—	1.0
Decolourization time	No. 1	1' 10"	1' 20"	1' 10"
	No. 2	1' 20"	1' 20"	1' 20"
	Average	1' 15"	1' 20"	1' 15"

Further, both substances consume nearly the same amount of iodine and also show an equally high redox potential toward the inert electrode. Finally, the absorption spectra of both solutions were photographed, the results of which are illustrated in Fig. 2. They show quite identical behavior.

Though we lack conclusive evidence, we can assume that the market preparation of candiolin contains a highly photoactive sub-

Fig. 2. Absorption curves of reducton and candiolin.



stance, which resembles in many respects the so-called reducton solution obtained by treating sugar with dilute alkali.

SUMMARY.

The market preparation of candiolin contains a substance which decolourizes methylenblue at pH 7.4 when exposed to light, and resembles in many respects the reducton solution of Euler, produced by treating monosaccharide with dilute alkali.

The author is glad to acknowledge the kindness of Dr. K. Kodama for his suggestions and of Dr. Y. Shoji for his encouragement throughout this research.

REFERENCES.

- Euler and Martius (1933): Sv. Kem. Tidskrift, **45**, 73.
Euler and Klusmann (1933): Z. f. physiolog. Chem., **217**, 167.
Fujita and Ebihara (1936): Tokyo Ijisinsi, **60**, 3445.
Neuberg and Sabetays (1925): Biochem. Z., **161**, 240.

EINE QUALITATIVE UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER PIKROLONSÄURE.

VON

SHINOBU FUKUDA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.

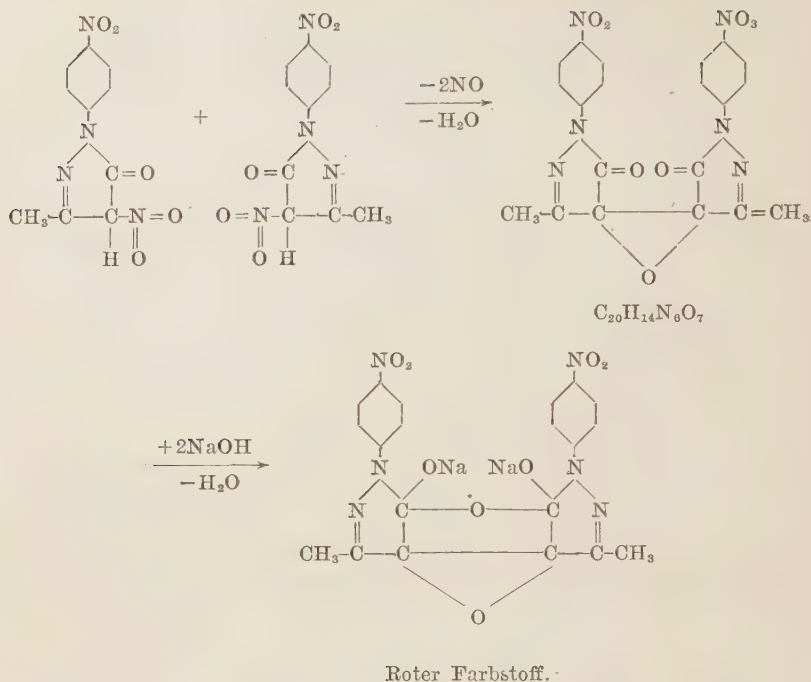
Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 25. September 1939)

Pikrinsäure sowie Pikrolonsäure sind seit langem vielfach zur Isolierung und Identifizierung mancher Verbindungen benutzt worden, da ihre Salze besonders schön und leicht krystallisierbar sind. Beide Salze sehen aber sehr ähnlich aus und die Präparate lassen häufig im Unklaren darüber, ob ein Pikrat oder ein Pikrolonat vorliegt. Es blieb daher der Wunsch bestehen, mit spezifischer und empfindlicher Reaktion die Pikrolonsäure nachzuweisen und in den Pikrolonaten den Gehalt an Pikrolonsäure leicht und mit kleinen Substanzmengen zu bestimmen.

Es ist seit Zeine (1906), Matthes und Rammstedt (1907) bekannt, dass die Pikrolonsäure durch rasches Erhitzen bei 124° unter Dunkelfärbung und stürmischer Gasentwicklung sich zersetzt. Bei der Nachprüfung dieser Reaktion habe ich konstatiert, dass man bei langsamem Erhitzen der Pikrolonsäure eine krystalline Masse bekommt, die scharf bei 170° schmilzt und eine Bruttoformel von $C_{20}H_{14}N_6O_7$ hat. Beim Zusatz von Alkalilaugen, besonders von Natronlauge zeigt diese Substanz eine tiefrote Färbung. Diese Farbenreaktion ist sehr empfindlich und man erhält bis zu einer Konzentration von 1:1,000,000 hinunter positive Resultate.

Durch Elementaranalysen und Spaltungsversuche wird festgestellt, dass die Verbindung $C_{20}H_{14}N_6O_7$ durch Kondensation aus 2 Molekülen Pikrolonsäure unter Wasser- und Stickstoffmonooxyd-Abspaltung entsteht. So wird gemäss folgender Gleichung eine Diketo-Verbindung erhalten, die sich nach Zusatz von Natronlauge sofort zu rotem Farbstoff umwandelt.



Durch weitere Versuche wurde eine strenge Spezifität der Reaktion für die Pikrolonsäure nachgewiesen und eine vollkommene Proportionalität der Farbstoffreaktion bei verschiedenen Pikrolonsäuremengen festgestellt. Es konnte mithin diese Reaktion zur kolorimetrischen Pikrolonsäurebestimmung Verwendung finden.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

I. Darstellung der Substanz $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_7$.

Reine Pikrolonsäure wurde in Trockenschrank oder im Ölbad unter langsamer Temperaturerhöhung bei $124\text{--}125^\circ$ eine Stunde lang erhitzt. Die braun gefärbte Krystallmasse wurde weiter bis auf 170° langsam erhitzt und nach dem Erkalten aus Chloroform umkrystallisiert.

Die Substanz löst sich leicht in Chloroform. In Wasser ist sie unlöslich. Sie schmilzt scharf bei 170° . Bei Zusatz von Alkali-

oder Erdalkalilaugen zeigt sie eine tiefrote Färbung, selbst bei Gegenwart von minimalen Spuren der Substanz. Der rote Farbstoff ist in Wasser löslich, dagegen in Äther, Chloroform, Aceton, Benzol, Eisessig, Äthyl-, Methyl- und Amylalkohol schwer löslich.

II. Konstitutionsermittlung der Substanz $C_{20}H_{14}N_6O_7$.

A. Analyse der beim Erhitzen der Pikrolonsäure entstandenen Gase.

Man musste bei Erhitzen von Pikrolonsäure die Möglichkeit einer Bildung von H_2O und NO in Erwägung ziehen. Um diese abgespalteten Gase zu bestimmen, wurde eine genau gewogene Menge von Pikrolonsäure im Schwefelsäurebad bei 170° langsam erhitzt, die Zersetzungsprodukte ins Verbrennungsrohr eingeleitet, in üblicher Weise verbrannt, um dann in den Absorptionsgefäßen gebunden zu werden. Dabei entstand keine Gewichtszunahme des Kaliapparates, folglich fehlte Kohlensäure. Dagegen nimmt das Chlorkalkrohr an Gewicht zu. Somit darf man die Bildung von Wasser vermuten.

Stickstoffmonoxyd wurde nach Lungescher Nitrometrie ermittelt.

0,4627 g Pikrolonsäure verloren beim Erhitzen 0,0683 g an Gewicht, gaben 0,0150 g H_2O .

Ber. für $C_{20}H_{14}N_6O_{10} - (H_2O + 2NO)$	Gewichtabnahme	H_2O
	14,77	3,41
Gefunden:	14,72	3,40

0,1037 g Pikrolonsäure gaben 8,80 ccm NO (21° , 768 mm), statt 9,36 ccm,

0,1325 g Pikrolonsäure gaben 11,40 ccm NO (21° , 768 mm), statt 11,98 ccm.

B. Elementaranalyse der Substanz $C_{20}H_{14}N_6O_7$.

Für die Analyse wurde die durch Erhitzen der Pikrolonsäure erhaltene Substanz in Chloroform mehrmals umkrystallisiert und im Exsiccator bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

0,0318 g Subst. 0,0621 g CO_2 , 0,0088 g H_2O .

3,205 mg Subst. 0,501 ccm N ($15,5^\circ$ 765 mm).

Ber. für $C_{20}H_{14}N_6O_7$	C 53,33	H 3,11	N 18,67
Gefunden:	53,21	3,08	18,62

Sie erwiesen sich also als Kondensationsprodukt aus 2 Mole-

külen von Pikrolonsäure unter Abspaltung von 1 Mol. H_2O und 2 Mol. NO .

III. Abhängigkeit der Farbstärke der Reaktion von verschiedenen Bedingungen.

Bei der Untersuchung dieser Farbenreaktion ging ich so vor, dass ich zunächst für jede einzelne die optimalen Bedingungen in bezug auf Konzentration der verwendeten Reagentien und Arten der verwendeten Alkalilaugen feststellte, dann die Abhängigkeit der Farbstärke der Reaktion von dem Zeitverlauf prüfte.

A. Abhängigkeit der Farbstärke der Reaktion von Konzentration der verwendeten Reagentien.

Bei der Prüfung des Einflusses der Konzentration auf den Farbtiter zeigte sich zunächst, dass die Farbe bei der Normal-Alkalilösung von einer Konzentration von 0,0007–0,002 Proz. am deutlichsten zu sehen ist. Sie erwies sich als nicht proportional der Konzentration der Alkalien, vielmehr stieg sie schwächer an, als es der Konzentration entspricht.

Wenn der Farbtiter bei der Anwendung der Normal-Alkalilösung als Standard(=1,000) gemessen wird, kann man die Abhängigkeit der Farbstärke von Konzentration der verwendeten Alkalilaugen aus Tabelle I ersehen.

TABELLE I.

0,07 mg Substanz $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_7$ verwendet.			
Konzentration der Alkalilaugen	Verwendete Alkalilaugen		
	Li(OH)	Na(OH)	K(OH)
N/1	1,000	1,000	1,000
N/5	0,985	1,000	0,973
N/10	0,875	0,882	0,843
N/20	0,783	0,751	0,723

B. Verhalten der verwendeten Alkalilaugen.

Es war von Interesse diese Farbenreaktion durch Verschieden-

heiten der verwendeten Laugen näher zu vergleichen. Die Natron-, Kali- und Lithiumlauge zeigen gleichmässige Farbstärke, während die Erdalkalilaugen immer schwächere Färbung zeigen. Von den organischen Basen, welche meistens eine ganz schwache positive Reaktion zeigen, gibt das Methylamin auffallenderweise starke Rotfärbung, wodurch die Substanz $C_{20}H_{14}N_6O_7$ beim Nachweis von Methylamin anwendbar ist. Tabelle II zeigt das Verhalten der verschiedenen Alkalilaugen bei dieser Farbenreaktion. Dabei ist der Farbtiter bei Anwendung von n -NaOH-Lösung als Standard (=1,000) angemessen.

TABELLE II.

Menge der verwendeten Substanz $C_{20}H_{14}N_6O_7$	Normallösung der Laugen						
	NaOH	KOH	LiOH	Ba(OH) ₂	Ca(OH) ₂	Sr(OH) ₂	NH ₄ OH
0,01 mg	1,000	1,021	0,993	0,725	0,654	0,725	
0,03	1,000	1,008	1,007	0,783	0,725	0,803	0,642
0,05	1,000	0,983	1,011	0,728	0,682	0,820	0,625
0,07	1,000	1,007	0,973	0,760	0,708	0,705	0,588
0,09	1,000	1,000	1,000	0,753	0,611	0,753	0,600
0,12	1,000	1,000	1,002	0,826	0,650	0,738	0,587
0,15	1,000	0,987	0,976	0,830	0,553	0,678	0,525
0,20	1,000	1,008	1,000	0,803	0,641	0,693	0,573
0,25	1,000	0,997	0,993	0,867	0,685	0,781	0,533

C. Einfluss des Zeitverlaufes auf die Farbstärke.

Die rote Färbung wird nach kurzer Zeit nicht verändert. Die Farbstärke bleibt einige Stunden konstant, aber nach 3 Tagen wird sie zur Hälfte vermindert. Wenn man den Farbtiter nach 1 Stunde als Standard (=1,000) betrachtet, so kann der zeitliche Einfluss aus der Tabelle III ersehen werden.

Wie man aus den oben erwähnten Versuchsergebnissen ersieht, bestehen die optimalen Bedingungen bei der Untersuchung dieser Farbenreaktion darin, dass man 0,07–0,2 mg der Substanz $C_{20}H_{14}N_6O_7$ in 10 ccm n -NaOH gelöst und in einem Zeitverlauf von 1 Stunde kolorimetrisch ermittelt.

TABELLE III.

Verwendete Menge der Substanz $C_{20}O_{14}N_6O_7$ in 10 cc n-NaOH	Farbtiter nach							
	1 St.	2 St.	6 St.	12 St.	24 St.	48 St.	72 St.	120 St.
0,03 mg	1,000	0,976	0,921	0,891	0,825	0,700	0,450	0,355
0,07	1,000	0,991	0,853	0,840	0,831	0,681	0,491	0,385
0,15	1,000	1,000	0,970	0,910	0,798	0,670	0,500	0,400
0,20	1,000	1,000	0,977	0,912	0,803	0,682	0,530	0,390
0,25	1,000	0,986	0,930	0,903	0,833	0,660	0,512	0,385

IV. Kolorimetrische Bestimmung der Pikronsäure.

Um die Pikrolonsäure aus Pikrolonaten zu befreien, werden Pikrolonatlösungen mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wird abgedampft und der Rückstand im Trockenschrank oder im Ölbad unter langsamer Temperaturerhöhung bei 125° eine Stunde lang erhitzt und die zurückgebliebene Masse in n -NaOH gelöst und auf 10 ccm aufgefüllt. Die so bereitete rötlich gefärbte Lösung wird zur kolorimetrischen Bestimmung benutzt.

Die Standardlösung bereitet man folgenderweise: Eine genau abgewogene Menge von Substanz $C_{20}H_{14}N_6O_7$ (0,25 mg–0,7 mg) wird in Chloroform gelöst und in 100 ccm Bürette aufgefüllt. Eine bestimmte Menge dieser Chloroformlösung wurde aufgenommen und nach dem Verdampfen und Trocknen in 10 ccm n -NaOH gelöst.

Von dieser Standardlösung bekannter Konzentration nahm man jeweils 5 ccm und alles wie für die zu untersuchende Lösung. Die Konzentration der Pikrolonsäure in der Standardlösung wird nach Möglichkeit so bemessen, dass die Reaktionsfarbstärke annähernd der Farbstärke der zu untersuchenden Flüssigkeit gleich ist. Der kolorimetrische Vergleich wird dadurch wesentlich genauer.

Da der Farbstoff in der Lösung nicht beständig ist und die Farbstärke sich mit der Zeit verändert, so muss die Bestimmung spätestens in 5 Stunden ausgeführt sein.

Die Bestimmungen wurden an verschiedenen Pikrolonaten ausgeführt. Mit einem einfachen Apparate kann man die gefundenen Werte der Bestimmung schon bis auf 83 Proz. der berechneten erreichen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt.

TABELLE IV.

Angewendete Pikrolonate mg	Berechnet		Gefunden	
	Pikrolon- säure mg	Farbstoff mg	Farbstoff mg	Farbstoff Proz.
Arginin-Pikronat				
14,9889	9,0344	7,9051	6,6000	83,5
11,6543	7,0245	6,1462	5,3660	87,3
6,6709	4,0208	3,5181	3,0570	86,9
5,0054	3,0169	2,6397	2,2520	85,3
1,7148	1,0336	0,9044	0,7440	82,3
Lysin-Pikrolonat				
13,9146	8,9596	7,8397	6,6870	85,3
10,8058	6,9579	6,0879	5,3030	87,1
7,7475	4,9886	4,3649	3,6580	83,8
6,2291	4,0109	3,5094	2,9090	82,9
4,6058	2,9657	2,5949	2,1720	83,7
Spermidin-Pikrolonat $C_7H_{10}N_3 \cdot 3(C_{10}H_8N_4O_6)$				
10,6807	9,0279	7,8994	6,7750	85,7
9,5360	8,0603	7,0528	5,7550	81,6
8,2364	6,9618	6,0910	5,0740	83,3
7,0785	5,9831	5,2352	4,3300	82,7
2,3417	1,9789	1,7315	1,4290	82,5

LITERATUR.

Matthes u. Rammstedt (1907): Arch. f. Pharm., 245, 112.

Zeine (1906): Dissertation Jena 1906, 15.

zitiert in Arch. f. Pharm., 245, 112.



ÜBER DIE DREHUNGSSTEIGERUNG DER *d*-MILCHSÄURE.

VON

SHINOBU FUKUDA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 25. September 1939)

Bei unseren Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der Milchsäure handelte es sich oft darum, kleine Mengen *d*-Milchsäure zu ermitteln; bekanntlich ist die optische Aktivität dieser Säure an und für sich sehr gering, ausserdem noch ungemein empfindlich gegen Konzentrationsänderungen und Trocknung, sowie abhängig von der Natur des Lösungsmittels, sodass sie nur zu oft der Null sich nähert. Wir mussten daher unser Augenmerk auf die Eruiierung eines Mittels richten, das die Grösse der Drehung nach Möglichkeit steigert.

Es ist seit Walden (1897) bekannt, dass die optische Aktivität der Hydroxysäuren durch die Bildung von komplexen Salzen geändert wird. Wir haben aber unter den bisher bekannten Mitteln—Borsäure, Borax, Phenylhydrazin und Uranyl nitrat—kein für unsere Zwecke geeignetes gefunden, weil sie nur eine geringe Drehungszunahme bewirken.

Die Beobachtungen von R. O. Herzog und P. Slansky (1911), dass das Drehungsvermögen der *l*-Milchsäure durch Zusatz von molybdänsaurem Ammon erhöht wird, wurde meines Erachtens von niemanden zur Milchsäurebestimmung benutzt und die Ausführung der Ermittlungsmethode noch nicht streng festgelegt. So habe ich auf Veranlassung von Prof. Tomita die optimalen Bedingungen der Drehungssteigerung der *d*-Milchsäure gesucht.

Zu diesem Zwecke erwies sich ein Zusatz von molybdänsaurem Ammon als sehr geeignet, wenn man hierbei gewisse, leicht einzuhaltende Vorsichtsmassregeln anwandte. Bei optimaler Konzentration des molybdänsauren Ammons und der Milchsäure

erreicht die spezifische Drehung einen fünfzigmal grösseren Wert, so dass man mit so sehr kleinen Drehungswinkeln, wie sie sowohl die freie Milchsäure als auch ihre Salze zeigen, zu arbeiten imstande ist.

EXPERIMENTELLER THEIL.

1. Die Rotation der Milchsäure unter dem Einfluss von Borsäure wechselnder Konzentration.

Für die Versuche wurde reinste, aus Rinderfleisch dargestellte *d*-Milchsäure in 23,4 proz. Lösung verwendet. Die zugesetzte Borsäure ist eine 5 proz. wässrige Lösung. Versuchstemperatur 18°.

TABELLE I.

Versuchs-Nr.	Verwendete Menge von			Gesamtmenge der Lösung	Beobacht. Drehung	Spez. Drehung
	Milchsäure	Borsäure	Wasser			
1	1ccm	0ccm	9ccm	10 ccm	+ 0,05°	+ 2,14°
2	1	1	8	10	+ 0,05°	+ 2,13°
3	1	2	7	10	+ 0,07°	+ 2,99°
4	1	3	6	10	+ 0,09°	+ 3,86°
5	1	4	5	10	+ 0,10°	+ 4,26°
6	1	6	3	10	+ 0,10°	+ 4,26°
7	1	8	1	10	+ 0,12°	+ 5,12°
8	1	9	0	10	+ 0,12°	+ 5,12°

Wie man aus vorstehender Tabelle ersieht, steigt die spezifische Drehung der Milchsäure mit der Säurekonzentration von +2,14° auf +5,12°.

2. Die Rotation der Milchsäure unter Zusatz von Borax.

Verwendet man statt der Borsäure 6,7 proz. Boraxlösung, so ist es auch möglich, eine geringfügige Drehungserhöhung zu beobachten. Angewandte Substanz 23,4 proz. *d*-Milchsäurelösung. Versuchstemperatur 18°.

Wie vorstehende Zahlen zeigen, erreicht die Rotation bei einer Konzentration von 0,2 proz. Borax ihren Höhepunkt. Durch Er-

TABELLE II.

Versuchs-Nr.	Verwendete Menge von			Gesamtmenge der Lösung	Beobacht. Drehung	Spez. Drehung
	Milchsäure	Borax	Wasser			
1	1 ccm	0 ccm	9 ccm	10 ccm	+0,05°	+2,14°
2	1	1	8	10	+0,12°	+5,13°
3	1	2	7	10	+0,17°	+7,25°
4	1	3	6	10	+0,18°	+7,68°
5	1	4	5	10	+0,14°	+5,97°
6	1	5	4	10	+0,10°	+4,27°
7	1	6	3	10	+0,09°	+3,85°
8	1	7	2	10	+0,09°	+3,85°
9	1	8	1	10	+0,07°	+2,99°
10	1	9	0	10	+0,05°	+2,14°

höhung der zugesetzten Boraxmenge erfolgt eine Drehungsverminderung.

3. *Die Rotation der Milchsäure unter dem Einfluss von Uranylnitrat mit und ohne Zusatz von Kalilauge.*

Zur Anwendung kam eine 32,49 proz. *d*-Milchsäurelösung.

TABELLE III.

Versuchs-Nr.	Verwendete Menge von				Gesamtmenge der Lösung	Beobacht. Drehung	Spez. Drehung
	Milchsäure	40% Uranylnitrat	11,2% KOH	Wasser			
1	1 ccm	3 ccm	0 ccm	6 ccm	10 ccm	+0,02°	+0,62°
2	1	5	0	4	10	+0,03°	+0,92°
3	1	7	0	2	10	+0,06°	+1,84°
4	1	1	1	7	10	+0,05°	+1,53°
5	1	2	1	6	10	+0,06°	+1,84°
6	1	3	1	5	10	+0,07°	+2,15°
7	1	4	1	4	10	+0,09°	+2,76°
8	1	5	1	3	10	+0,12°	+3,68°
9	1	6	1	2	10	+0,13°	+3,99°
10	1	7	1	1	10	+0,10°	+3,07°
11	1	8	1	0	10	+0,10°	+3,07°

40 proz. Uranylnitratlösung wurde in verschiedenen Mengen zugesetzt. Versuchstemperatur 26°.

Gegenüber der Äpfelsäure erlangt die an sich schwach drehende Milchsäure kein starkes Rotationsvermögen, wenn sie auch mit einer Lösung von Uranylsalzen im richtigen Verhältnis versetzt wird.

4. Über den Einfluss des Phenylhydrazins auf die Milchsäuredrehung.

Zu diesen Versuchen diente 32,49 proz. *d*-Milchsäurelösung. Phenylhydrazin ist als 26,5 proz. alkoholische Lösung angewendet. Versuchstemperatur 26°. Die Ergebnisse sind aus Tabelle IV ersichtlich.

TABELLE IV.

Versuchs- Nr.	Verwendete Menge von			Gesamt- menge der Lösung	Beobacht. Drehung	Spez. Drehung
	Milchsäure	Phenyl- hydrazin	Alkohol			
1	1 ccm	1 ccm	8 ccm	10 ccm	+0,25°	+ 7,67°
2	1	3	6	10	+0,25°	+ 7,67°
3	1	5	4	10	+0,35°	+10,75°
4	1	7	2	10	+0,30°	+ 9,21°
5	1	9	0	10	+0,34°	+10,44°

Wie vorstehende Zahlen zeigen, ist die spezifische Drehung der Milchsäure in geringem Masse von dem Phenylhydrazinzusatz abhängig.

5. Die Drehungssteigerung der *d*-Milchsäure durch Zusatz von molybdänsaurem Ammon.

Die zu dem Versuchen verwendete Milchsäure wurde aus Rindermuskeln dargestellt und als Zinksalz gereinigt. 32,49 proz. freie Säure wurde angewendet. Je 1 ccm *d*-Milchsäurelösung wurden 1–9 ccm 22,6 proz. Ammonmolybdatlösung zugesetzt. Mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt, erfolgte die Ablesung bei 27°.

Die Resultate sind aus Tabelle V ersichtlich.

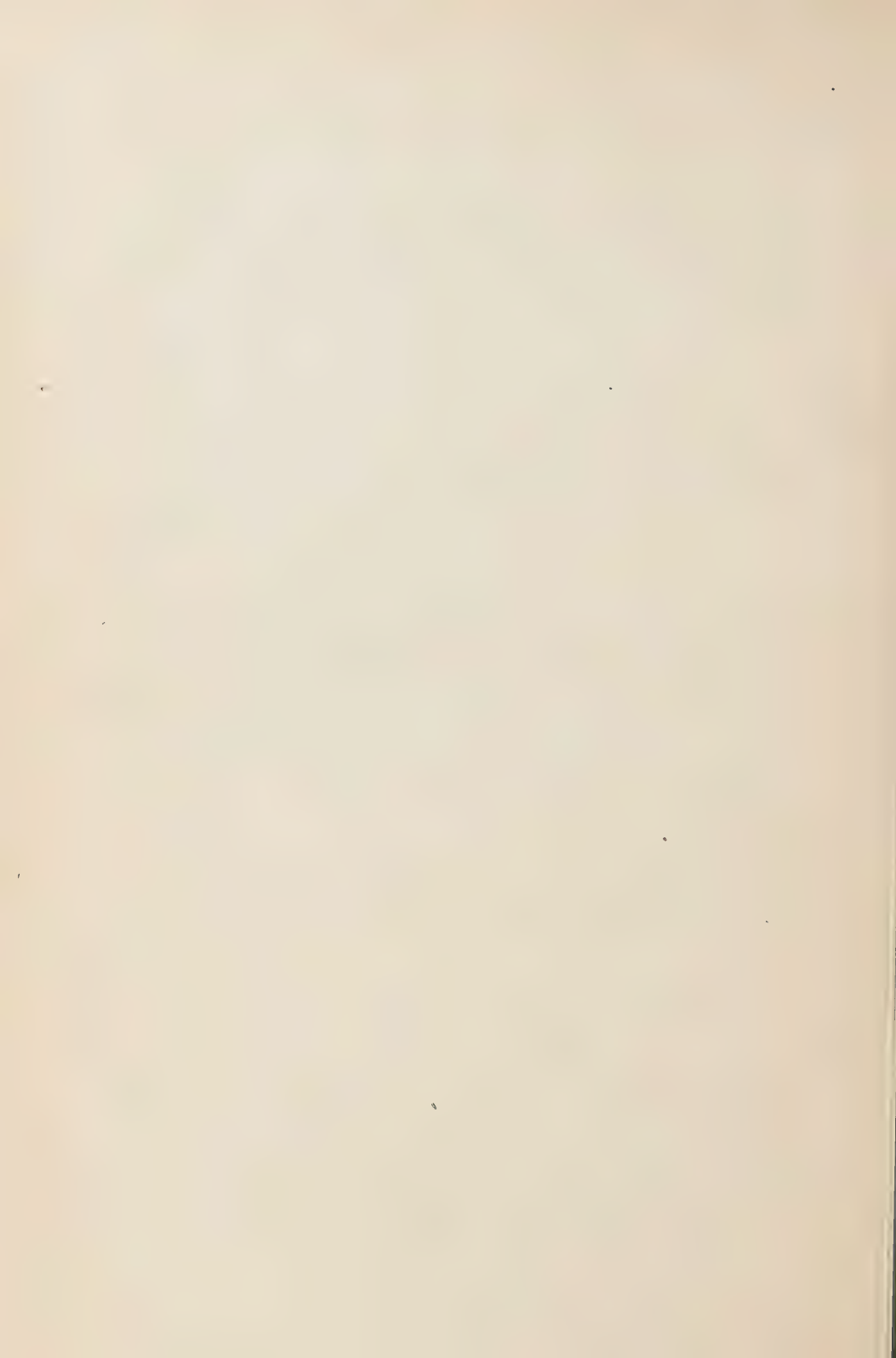
TABELLE V.

Versuchs-Nr.	Verwendete Menge von			Gesamtmenge der Lösung	Beobacht. Drehung	Spez. Drehung
	Milchsäure	Ammon-molybdat	Wasser			
1	1 ccm	0 ccm	9 ccm	10 ccm	+ 0,06°	+ 1,85°
2	1	1	8	10	+ 1,00°	+ 30,76°
3	1	2	7	10	+ 2,23°	+ 68,80°
4	1	3	6	10	+ 2,66°	+ 81,73°
5	1	4	5	10	+ 2,86°	+ 88,27°
6	1	5	4	10	+ 2,77°	+ 85,63°
7	1	6	3	10	+ 2,73°	+ 82,01°
8	1	7	2	10	+ 2,62°	+ 80,98°
9	1	9	0	10	+ 2,50°	+ 75,79°

Die Versuche zeigen also, dass die Anwendung von molybdänsaurem Ammon eine erhebliche Drehungssteigerung (etwa 50 mal) gestattet. Das Maximum der Drehung liegt bei Versuch 5 bzw. 6, wenn auf 5 mol Milchsäure 1 mol molybdänsaures Ammonium kommt; die Drehung ist dabei etwa fünfzig mal grösser, als die Anfangsdrehung der reinen Milchsäurelösung. Die Richtung der Ablenkung ist unverändert geblieben.

LITERATUR.

- Herzog, R. O. und Slansky, P. (1911): H-S, 73, 242.
 Walden, P. (1897): B., 30, 2889.



CHEMIE DER SCHLANGEN.

I. Über die N-haltigen Extraktivstoffe der Schlangemuskeln.

VON

HIROYUKI IMAMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 25. September 1939)

Alle Erdteile beherbergen Schlangen, aber keinesweges in annähernd gleicher Anzahl. Die Schlangen unterliegen den allgemeinen Verbreitungsgesetzen der Kriechtiere und nehmen um so rascher an Zahl der Arten und Einzelwesen ab, je höher die Breite ist. Das ostasiatische Gebiet ist das Schlangenreichste, vielleicht auch das am besten durchforschte der Erde. Die Anzahl der in Formosa lebenden Schlangenarten ist über 60, ein viertel davon gehört zu den Giftschlangen.

Über die Einteilung der Schlangen, die Umgrenzung der Familien und Gattungen, gehen die Ansichten der heutigen Schlangenkundigen einigermassen auseinander. Nach Ansicht neuerer Forscher stellen die Schlangen nur einen eigentümlich entwickelten Seitenzweig der Schuppenkriechtiere dar und weichen durch keinerlei tiefeingreifende Merkmale von letzteren ab, zumal der Mangel eines Schultergürtels und das Fehlen der Harnblase Eigentümlichkeit sind, auf die das Verhalten gewisser Eidechsen vorbereitet. Die Beobachtungen, dass bei einer kleinen Anzahl von Schlangen sogar Reste von Schultermuskeln und von Armblutgefäßen auftreten können, lehren uns, dass die Schlangen in der Vorzeit aus vierfüßigen, eidechsenartigen Tieren entstanden sein müssen.

Um die natürlichen Verwandtschaftsverhältnisse der Tiere zu ermitteln und die Klassifikation der Familien und Gattungen aufzustellen, haben morphologische Untersuchungen schon so vieles

geleistet, während die biochemischen Studien so befremdend wenig Beachtung erfuhren.

Die Lehre von der vergleichenden Biochemie kann eine grosse Rolle in der Anbahnung eines klaren morphologischen Verhältnisses spielen. Indem so beide, also morphologisch und biochemisch, auf den genannten Arbeitsgebieten gewonnenen Resultate sich gegenseitig ergänzen und zu einem einheitlichen Ganzen durchdringen, entspringt daraus eine helle Leuchte für unsere Erkenntnis der tierischen Organisation.

In den Wirbeltiergruppen nehmen die Vögel und Reptilien durch die Form ihrer Stickstoffausscheidung eine Sonderstellung insofern ein, als nicht Harnstoff, sondern Harnsäure der Hauptträger des Stickstoffes in ihrem Harn ist. Danach konnte man vermuten, dass sich auch unter den Extraktstoffen der Sauropsidenmuskeln andere Substanzen finden liessen als bei den übrigen Wirbeltieren. Seit langen Jahren haben Kutscher, Ackermann (1924–1929) und ihre Schüler über eine ganze Reihe bisher unbekannter organischer Körper aus Muskelextrakten von verschiedenen Tierklassen vergleichend-biochemische Untersuchungen angestellt. Als basische Bestandteile der Muskulatur von Python haben sie Kreatin, Methylguanidin, Adenin, Carnosin und Butyrobetain gefunden. Ferner wurden ein Pikrolonat, dessen Identität mit Histidinpikrolonat zweifelhaft bleiben musste, und ein Pikrat von der summarischen Formel $C_5H_{14}N_2 \cdot 2(C_6H_3N_3O_7)$ isoliert.

In dem Laboratorium von Prof. Tomita hat I. Takahashi (1935) in den Nattermuskeln einen verhältnismässig grossen Gehalt von Sulfaten gefunden. Wir haben also unter den Muskelextraktstoffen unser Interesse einerseits auf Taurin gewendet und an verschiedenen Schlangenkörpermuskeln vergleichend untersucht, weil diese Verbindung ein Repräsentant der organischen Sulfonsäuren ist und durch Umwandlung des Cystins entsteht, welches sich in den Hornsubstanzen der Epidermis besonders reichlich findet. Andererseits schenken wir unsere Aufmerksamkeit speziell den basischen, also den mit Phosphorwolframsäure fällbaren Anteilen der Extraktstoffe.

VERSUCHSTEIL.

*A. Mengenverhältnisse des Kreatins, Kreatinins und
Taurins in Muskeln der verschiedenen
Arten von Schlangen.*

Frische Muskeln von 10 Arten der Schlangen wurden in bekannter Weise auf Kreatin, Kreatinin und Taurin bearbeitet.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle I verzeichnet.

TABELLE I.

Arten der Schlangen	Menge des verwendet. Muskels	Kreatinin		Kreatin		Taurin
		mg	%	mg	%	
Naja Naja Atra	6,84	0,383	0,0056	12,400	0,1813	+
Ptyas Korros	6,49	0,376	0,0058	29,063	0,4478	+
Bungarus Multicinctus	5,52	0,320	0,0058	21,876	0,3963	—
Liopeltis Major Major	7,73	0,347	0,0045	34,484	0,4461	+
Elaphe Carinata	7,51	0,315	0,0042	27,930	0,3719	+
Trimeresurus Macrosquamatus	11,17	0,659	0,0059	42,915	0,3842	+
Enhydris Plumbea	8,01	0,369	0,0046	28,523	0,3521	+
Agkistrodon Acutus	9,52	0,543	0,0057	33,777	0,3548	+
Zaocys nigromarginatus	11,34	0,658	0,0058	40,559	0,3577	+
Natrix annularis	12,04	0,686	0,0057	42,972	0,3569	+

Es ist sehr merkwürdig, dass einer Art von Schlangen, Bungarus Multicinctus das Taurin in Muskelextraktstoffen fehlt, während es bei anderen untersuchten Schlangen so reichlich vorhanden ist.

*B. Isolierung der N-haltigen Muskelextraktstoffe
der Schlangen.*

Es ist äusserst schwer, die Schlangemuskeln von den Skeletten vollständig zu präparieren und eine reichliche Menge von isolierten Muskeln zu bekommen. Bei Schlangen kann man ebenso viele Zwischenrippenmuskeln zählen wie Rippen; ausserdem verlaufen längs des Rückenmarks Muskeln, die an den vielen Rippen und

Wirbeln zahlreiche Befestigungspunkte finden. Wir mussten deshalb nach dem Entfernen der Haut und Eingeweide mit Alkohol und Äther behandeln und dann mit heissem Wasser so lange extrahieren, bis die Ablösung der Muskeln von den Skeletten möglich war. Die Gewichtsdifferenz vor und nach den oben erwähnten Behandlungen der von Haut und Eingeweiden getrennten Rumpfteile kann einfachheitshalber als die Menge der verwendeten Muskeln angenommen werden.

Als Untersuchungsmaterial habe ich die Muskeln von *Naja Naja Atra* (Kobra), *Bungarus Multicinctus* und *Elaphe carinata* verwendet.

Der Wasserextrakt der Muskeln wurde zunächst durch Hitze-koagulation und dann mit Tannin-Blei-Methode vollständig entei-weisst. Das Filtrat wurde nach dem Beseitigen des Bleies so weit eingeeengt, bis das Taurin sich ausscheidet. Man engt das Filtrat ein und fällt in schwefelsaurer Lösung mit Phosphorwolframsäure. Das Phosphorwolframat wurde in üblicher Weise in Histidin-, Arginin- und Lysin-Fraktion getrennt.

I. Die Muskulatur von Naja Naja Atra.

Die Basenverteilung in den einzelnen Fraktionen habe ich im eiweissfreien Extrakt aus 19,33 kg Muskulatur vorgenommen.

A. Histidin-Fraktion. Aus der Histidin-Fraktion bekommt man 1,74 g des Pikrolonates, welches bei 237° schmilzt. Es zeigt eine Pauly's Diazoreaktion. Die Analysen ergaben folgendes:

3,060 mg Subst. 5,120 mg CO₂, 1,350 mg H₂O,

3,655 mg Subst. 0,691 ccm N (32°, 764 mm).

Berechnet für C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₄ ·C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₅ :	C 46,15	H 4,65	N 21,53
Gefunden:	45,63	4,94	21,27

Zur Bestimmung der Pikrolonsäure und zugleich des Aminostickstoffes nach van Slyke wurde das gewogene Pikrolonat in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure zerlegt und dann mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde abgedampft und gewogen. Die wässrige Lösung diente für die Bestimmung des Aminostickstoffes.

0,3724 g des Pikrolonates gaben 0,1959 g Pikrolonsäure.

Berechnet für $C_{10}H_{16}N_4O_4 \cdot C_{10}H_8N_4O_6$: Pikrolonsäure 50,76%
 Gefunden: " 52,61

Die von Pikrolonsäure befreite wässrige Lösung, die nach der Berechnung 0,1840 g freie Substanz enthält, ergab 20,3 ccm N (26° , 763 mm).

Berechnet für $C_{10}H_{14}N_3O_4(NH_2)$: Amino-N 5,46%
 Gefunden: " 6,11

Die Analysendaten dieser Verbindung stimmen also mit denen des Histidins nicht überein. Eine ähnliche Verbindung hat Ackermann (1924) auch aus Histidin-Fraktion der Pythonmuskeln isoliert, deren Analysen dem Histidin nicht entsprechen.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse und der Bestimmungen der Pikrolonsäure und des Aminostickstoffes stimmen auch mit denen der Substanz der summarischer Formel $C_{10}H_{16}N_4O_4$ überein.

Eine grössere Menge dieser Verbindung wird aus der Lysin-Fraktion als Pikrolonat isoliert.

B. Arginin-Fraktion. Die Silberverbindungen dieser Fraktion behandelte ich, nachdem sie mit verdünnter Schwefelsäure verrührt waren, in der Wärme mit Schwefelwasserstoff, beseitigte aus dem Filtrat des so entstandenen Schwefelsilbers den Schwefelwasserstoff durch Abdunsten und die Schwefelsäure mit Baryt. Nachdem der überschüssige Baryt mit Kohlensäure ausgefällt war, wurde das Filtrat mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt. Dabei schieden sich 0,72 g des Pikrates aus.

Das Pikrat ergab die folgenden Analysendaten:

3,690 mg Subst.	4,975 mg CO_2 ,	1,235 mg H_2O ,		
3,670 mg "	4,915 mg "	1,235 mg "		
3,330 mg "	4,460 mg "	1,130 mg "		
3,905 mg "	5,200 mg "	1,290 mg "		
2,940 mg "	0,519 ccm N (30° ,	763 mm)		
3,425 mg "	0,603 ccm N (30° ,	763 mm)		
3,335 mg "	0,588 ccm N (30° ,	761 mm)		
3,410 mg "	0,598 ccm N (30° ,	762 mm)		
Ber. für $C_8H_{14}N_2 \cdot 2(C_6H_3N_3O_7)$:	C 36,77%	H 3,60%	N 20,01%	
Gefunden:	36,77	3,74	19,96	
	36,52	3,74	19,91	
	36,53	3,80	19,89	
	36,32	3,70	19,81	

Zur Bestimmung der Pikrinsäure und zugleich des Aminostickstoffes nach van Slyke wurde das gewogene Pikrat in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und dann mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde abgedampft und gewogen. Es ergab 82,39% Pikrinsäure, statt der berechneten 81,78%. Die wässerige Lösung wurde für Amino-N-Bestimmung gebraucht. Aus 0,1636 g des Pikrates resultieren nach der Berechnung 0,0298 g freie Substanz, sie gaben 1,34 ccm N (29°, 764,8 mm).

Berechnet für $C_6H_{10}(NH_2)_2$:	Amino-N	27,45%
Gefunden:	"	24,58

Die freie Substanz ist optisch inaktiv; ihre wässerige Lösung zeigt keine Sakaguchi'sche Reaktion.

Es unterliegt also kaum einem Zweifel, dass die hier erhaltene Substanz mit Cadaverin identisch ist.

C. Lysin-Fraktion. Das Filtrat der Arginin-Fraktion wurde nach Beseitigung des Silbers und erneuter Fällung mit Phosphorwolframsäure in einer Lösung der kohlensauren Basen übergeführt. Diese Fraktion stellte einen reichlichen Sirup dar. Da man beim Zusatz von Pikrinsäure keine krystallinische Fällung bekam, so wurden die harzigen Niederschläge mit Schwefelsäure zerlegt und mit Äther extrahiert. Die von Pikrinsäure befreite saure Lösung wurde mit Baryt und dann mit Kohlensäure behandelt; die regenerierte Basenlösung wurde dann mit Pikrolonsäurelösung versetzt. Dabei schieden sich reichliche Krystalle aus. Nach wiederholter Umkrystallisierung bekommt man ein Pikrolonat, welches bei 237° schmilzt. Diese Verbindung ist die Hauptsubstanz der basischen Extraktstoffe der Kobramuskeln. Ausbeute 18,22 g als Pikrolonat.

Eine geringere Menge dieser Verbindung wurde in der Histidin-Fraktion gefunden.

Zur Analyse wurde das Salz bis zum konstanten Gewicht im Exsiccator getrocknet.

4,275 mg Subst.	7,230 mg CO ₂ ,	1,870 mg H ₂ O,
3,650 mg "	6,170 mg "	1,610 mg "
3,115 mg "	0,583 ccm N (30,5°, 761 mm)	
3,890 mg "	0,720 ccm N (30,5°, 760 mm)	

Ber. für $C_{10}H_{10}N_4O_4 \cdot C_{10}H_8N_4O_6$:	C 46,13%	H 4,65%	N 21,54%
Gefunden:	46,12	4,89	21,08
	46,08	4,93	20,82

Zur Bestimmung der Pikrolonsäure und zugleich des Aminostickstoffes wurde das gewogene Pikrolonat mit Schwefelsäure zerlegt, und mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde abgedampft und gewogen.

0,2348 g Pikrolonat gaben 0,1189 g Pikrolonsäure.

Ber. für $C_{10}H_{10}N_4O_4 \cdot C_{10}H_8N_4O_6$:	Pikrolonsäure 50,76%
Gefunden:	" 50,63

Die wässrige Lösung wurde in üblicher Weise auf Aminostickstoff-Bestimmung verarbeitet. Aus 0,2348 g des Pikrolonates resultieren nach der Berechnung 0,1156 g freie Substanz, welche 13,5 ccm N bei 28° und 766 mm ergab.

Ber. für $C_{10}H_{14}N_8O_4(NH_2)$:	Amino-N 5,46%
Gefunden:	" 6,43

Für die optische Bestimmung dienten eine wässrige und eine salzsaure Lösung.

$$[\alpha]_D^{20} = +43,59^\circ \text{ (in salzsaure Lösung)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = +19,65^\circ \text{ (in Wasser)}$$

Die wässrige Lösung zeigt eine Ninhydrin- und Pauly's Diazoreaktion.

Die Resultate der Analyse dieses Körpers stimmen also mit denen der Substanz der summarischer Formel $C_{10}H_{16}N_4O_4$ überein.

Wenn man das Pikrolonat von Schmelzpunkt 237° vollständig auskrystallisieren lässt und das Filtrat einengt, so bekommt man ein zweites Pikrolonat, welches bei 152° schmilzt. Ausbeute 5,0 g.

Es ergab folgende Analysendaten:

3,848 mg Subst.	6,350 mg CO_2 , 1,540 mg H_2O ,
3,760 mg "	6,220 mg " 1,490 mg "
3,860 mg "	6,370 mg " 1,530 mg "
3,882 mg "	6,420 mg " 1,460 mg "
3,335 mg "	0,593 ccm N (27°, 762 mm)
3,290 mg "	0,578 ccm N (26°, 765 mm)
3,095 mg "	0,534 ccm N (21,5°, 763 mm)
3,690 mg "	0,637 ccm N (21,5°, 763 mm)

Ber. für $C_6H_{14}N_2O_3 \cdot 2(C_{10}H_{16}N_4O_5)$:	C 45,19%	H 4,38%	N 20,27%
Gefunden:	45,00	4,48	20,28
	45,12	4,43	20,19
	45,01	4,41	20,08
	45,11	4,21	20,09

Zur Bestimmung des Aminostickstoffes wurden 0,1422 g des Pikrolonates (=0,0334 g freie Substanz) mit Schwefelsäure zerlegt; nach der Beseitigung der Pikrolonsäure wurde der Amino-Stickstoff nach van Slyke ermittelt.

0,0334 g Subst. 10,3 ccm N (29°, 764,5 mm)

Ber. für $C_6H_{10}O_3(NH_2)_2$:	Amino-N	17,27%
Gefunden	"	16,85

Für die optische Bestimmung diente eine wässrige Lösung.

$$[\alpha]_D^{20} = +45,06^\circ.$$

Zur Konstitutions-Ermittlung dieser Verbindung sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die Ergebnisse der Untersuchung bei Kobramuskeln sind im folgenden tabellarisch niedergelegt.

TABELLE II.

Aus 19,33 kg frischen Muskeln von Naja Naja
Atra

Fraktion	Extraktivstoffe	Freie Subst. oder Salze	Schmp.	Ausbeute
	Taurin	frei		10,69 g
Arginin-Fr.	Cadaverin	Dipikrat	217°	0,72 g
Histidin-Fr.	$C_{10}H_{16}N_4O_4$	Pikrolonat	237°	0,72 g
Lysin-Fr.	"	"	"	18,22 g
"	$C_6H_{14}N_2O_3$	Dipikrolonat	158°	5,00 g

II. Die Muskulatur von *Bungarus Multicinctus*.

Nachdem ich durch meine voranstehende Untersuchung feststellte, dass die Extraktstoffe des Kobramuskels in ihrer Zusammensetzung eine Abweichung von denen des Pythonmuskels zeigen, lag es nahe, nun auch die Muskulatur der anderen Schlangenarten einem näheren Studium zu unterziehen.

Ich verwendete für diesen Zweck 21,3 kg frische Muskeln von *Bungarus Multicinctus*. Die Aufarbeitung der Extraktstoffe beschränkte sich auch hier nur auf den mit Phosphorwolframsäure fällbaren Anteil.

A. Histidin-Fraktion. In dieser Fraktion wurden das Carnosin und das Anserin vergeblich gesucht. Da die Menge der Basen nicht so spärlich war, so mussten in dieser Fraktion Imidazolderivate sich finden; gleichwohl sind alle Bemühungen, hier zu einem definitiven Körper zu kommen, bisher erfolglos gewesen.

B. Arginin-Fraktion. Aus der Arginin-Fraktion schieden sich bei Eindampfung der Flüssigkeit und beim Zusatz von Pikrinsäurelösung schöne Krystalle aus, die sich nach ihrer Zusammensetzung mit dem Pikrat des Methylguanidins identisch erwiesen. Es wurden im ganzen etwa 1,2 g dieses Salzes erhalten.

3,320 mg Subst. 3,890 mg CO₂, 0,920 mg H₂O,

3,495 mg " 4,105 mg " 0,950 mg "

2,825 mg " 0,657 ccm N (20,5°, 766 mm)

3,240 mg " 0,756 ccm N (21°, 766 mm)

Ber. für C₂H₇N₃.C₆H₃N₃O₇: C 31,78% H 3,31% N 27,81%

Gefunden: 31,96 3,10 27,26

32,03 3,04 27,31

Aus dem Filtrat des Methylguanidin-pikrates bekam ich 1,1 g des Kreatininpikrates.

C. Lysin-Fraktion. Wenn man die Lysin-Fraktion stark einengte, so schieden sich reichliche Krystalle aus, die sich nach den chemischen Eigenschaften und Analysen mit dem Kreatinin identisch erwiesen. Im ganzen wurden 14,5 g des freien Kreatinins erhalten. Das Filtrat wurde eingengt und mit Pikrinsäurelösung versetzt. Da man dabei keine krystallinische Fällung bekam, so hat man die von Pikrinsäure befreite Flüssigkeit in Chlorhydrat übergeführt und dann mit Sublimatlösung gefällt. Diese Sublimat-Fällung wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und nach der Beseitigung des Quecksilbersulfides und Schwefelwasserstoffes stark eingengt und dann mit Pikrolonsäurelösung gefällt. Durch wiederholtes Umkrystallisieren gelang es, ein Pikrolonat vom Schmp

—237° zu erhalten, welches mit dem aus Kobramuskeln erhaltenen Pikrolonat identisch ist. Es wurden 8.0 g des Salzes erhalten. Die Analysen ergaben folgendes:

3,615 mg Subst.	6,060 mg CO ₂ ,	1,600 mg H ₂ O,
3,660 mg "	6,140 mg "	1,605 mg "
3,160 mg "	0,616 ccm N (30,5°, 759 mm)	
3,100 mg "	0,593 ccm N (28,5°, 759 mm)	
Ber. für C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₄ .C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₅ : C 46,13% H 4,65% N 21,54%		
Gefunden: 45,72 4,95 21,89		
45,75 4,91 21,63		

Die Untersuchungsergebnisse des Muskels von *Bungarus Multicinctus* sind kurz in Tabelle IV zusammengestellt.

TABELLE III.

Aus 21,3 kg frischen Muskeln von <i>Bungarus Multicinctus</i>				
Fraktion	Extraktivstoffe	Freie Subst. oder Salze	Schmp.	Ausbeute
Arginin-Fr.	Methylguanidin	Pikrat	201°	1,2 g
"	Kreatinin	Pikrat	213°	1,1 g
"	"	frei		14,5 g
Lysin-Fr.	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₄	Pikrolonat	237°	8,0 g

III. Die Muskulatur von *Elaphe carinata*.

Das Ziel dieses Versuches war, die basischen Extraktstoffe des Fleisches von *Elaphe carinata* zu untersuchen und die Frage über das Vorkommen von Substanzen darin aufzuklären, die in dem Muskelgewebe von *Python*, *Kobra* und *Bungarus Multicinctus* aufgefunden worden sind.

Die Versuchsanordnung und Ausführung der Basenisolierung geschah ähnlich wie in den voranstehenden Experimenten. Als Ausgangsmaterial dienten 23,45 kg frische Muskeln.

A. *Histidin-Fraktion*. In dieser Fraktion wurde das Carnosin gesucht. 0,8 g Cu-Salz der als Carnosin angenommenen Verbindung wurden erhalten, obwohl die Analysendaten mit denen des Carnosins nicht gut übereinstimmen.

B. Arginin-Fraktion. Aus dieser Fraktion wurden geringe Mengen von Kreatinin als Pikrat isoliert.

C. Lysin-Fraktion. Die Menge der Basen war in dieser Fraktion sehr reichlich. Einen erheblichen Anstieg der Menge im Vergleich zu den anderen Schlangenarten erwiesen die Kaliumwismutjodid-Niederschläge. Man erhielt daraus 28,7 g Kreatinin. Aus der Mutterlauge wurden 1,2 g des Pikrates von Trimethylamin isoliert.

4,260 mg Subst.	5,850 mg CO ₂ ,	1,460 mg H ₂ O,	
3,545 mg "	4,830 mg "	1,190 mg "	
3,860 mg "	0,621 cem N (11°, 770 mm)		
3,790 mg "	0,615 cem N (11°, 767 mm)		
Ber. für C ₅ H ₉ N.C ₆ H ₅ N ₃ O ₇ :			
	C 37,50%	H 4,16%	N 19,40%
Gefunden:			
	37,45	3,83	19,59
	37,16	3,76	19,68

Die Mutterlauge des Trimethylamin-pikrates wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Die von der Pikrinsäure befreite Basenlösung wurde mit Pikrolonsäurelösung versetzt. Dabei schieden sich reichliche Krystalle (8,0 g) aus, die nach wiederholter Umkrystallisierung scharf bei 237° schmolzen und die folgenden Analysendaten ergaben.

3,915 mg Subst.	6,585 mg CO ₂ ,	1,700 mg H ₂ O,	
3,505 mg "	5,860 mg "	1,500 mg "	
3,560 mg "	0,613 cem N (16°, 771 mm)		
3,775 mg "	0,666 cem N (16,5°, 774 mm)		
Ber. für C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₄ .C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₈ :			
	C 46,13%	H 4,65%	N 21,54%
Gefunden:			
	45,87	4,86	20,63
	45,60	4,95	21,18

Die Resultate der Analyse dieses Körpers stimmen mit denen der Substanz gut überein, welche aus der Lysin-Fraktion des Muskelextraktes von Kobra und Bungarus Multicinctus reichlich isoliert worden ist.

Die Ergebnisse sind in Tabelle IV wiedergegeben.

Fassen wir die Versuchsergebnisse bei drei verschiedenen Schlangenarten zusammen und vergleichen wir diese Ergebnisse mit den Angaben anderer Autoren über das Muskelgewebe der verschiedenen Tiere miteinander, so wird ersichtlich, dass gewisse

TABELLE IV.

Aus 23,4 kg frischen Muskeln von <i>Elaphe carinata</i> .				
Fraction	Extraktivstoffe	Freie Subst. oder Salze	Schmp.	Ausbeute
Histidin-Fr.	Carnosin?	Cu-Salz		0,8 g
Arginin-Fr.	Kreatinin	Pikrat	213°	wenig
"	"	frei		28,7 g
Lysin-Fr.	Trimethylamin	Pikrat	216°	1,2 g
"	$C_{10}H_{16}N_4O_4$	Pikrolonat	237°	8,0 g

Arten der Extraktivstoffe bei einigen Schlangenarten vorkommen, bei anderen überhaupt fehlen. Andererseits wurde eine basische Substanz $C_{10}H_{16}N_4O_4$ aus der Lysinfraction aller untersuchten Schlangemuskeln immer reichlich abgetrennt. Dieser Verbindung begegneten wir zum erstenmal in der Muskulatur.

Der Übersichtlichkeit halber sind die Ergebnisse meiner Untersuchungen in Tabelle V kurz dargestellt:

TABELLE V.

Extraktivstoffe der Muskulatur	Schlangenarten		
	<i>Naja naja atra</i>	<i>Bungarus multicinct.</i>	<i>Elaphe carinata</i>
Taurin	++	—	+
Kreatinin	++	++	+++
Methylguanidin		+	
Cadaverin	+		
Trimethylamin			+
Carnosin		±	±
$C_{10}H_{16}N_4O_4$	++	++	++
$C_6H_{14}N_2O_3$	++		

LITERATUR.

- Ackermann, D. (1924): Zs. Biol., **81**, 61.
 Ackermann, D., Timpe, O. u. Poller, K., (1929): H-S, **183**, 1.
 Kutscher, F. (1925): Zs. Biol., **84**, 181.
 Takahashi, I. (1935): Jl. Biochem., **22**, 1.

INDEX TO VOLUME 30.

A

- Acetaldehyde, On the influence of various kinds of nutrition upon the ——— formation in the liver. 251.
- Acetaldehyde, The ——— formation in the liver of dog nourished by a normal mixed diet. 251.
- Acetyl, Über die Arginasewirkung auf ——— l-phenylalanyl-d-arginin. 271.
- AIZAWA, Katsuse. Studien über Carbohydrate. I. Die fermentative Hydrolyse der p-Nitrophenol-glukoside. 89.
- AKAO, Akira. Beiträge zur Wachstumphänomen des Seidenspinners (I). Die verschiedenen aufbauenden und katalytischen Elemente und deren biologische Bedeutung während des Wachstums. 303.
- γ -Amino- β -oxy-buttersäure, Über die Stereoisomerie der ———. 101.
- Aminosugar, An estimation of free blood-sugar in the co-presence of ———. 29.
- Aminosugar, Estimation of free ——— in urines, normal and diabetic. 199.
- Arginasewirkung, Über die ——— auf Acetyl l-phenylalanyl-d-arginin. 271.
- Arginasewirkung, Über die ——— bei der Leberautolyse. 265.
- Artificial saliva mucin, "Sublingual mucoid" and an ———. 11.
- C-Avitaminose, Über den Gehalt der Gewebe an hochungsättigten Ke-

phalin bei der ———. 155.

B

- Base, Über die n-haltigen Extraktivstoffe, besonders die organischen ——— der Bauchspeicheldrüse. 141.
- Bauchspeicheldrüse, Über die N-haltigen Extraktivstoffe, besonders die organischen Basen der ———. 141.
- BEARD, Howard H. The chemical nature of an aqueous extract of the suprarenal cortex of sheep. 1.
- Bile, Isolation of choleic acid from dog. 55.
- Blood-sugar, An estimation of free ——— in the co-presence of aminosugar. 29.
- Blut, Die ontogenetische Untersuchung von Kupfer und Eisen im ——— der Hühnerembryonen. 33.
- Blutgerinnung, Über das Kephalin bei der ———. 147.
- Blutphosphatase, Über die Mikrobestimmung der ———. 69.

C

- Candiolin, A photoreducing substance contained in the commercial ———. 459.
- Carbohydrate, Studien über ———. 89.
- Carbohydrate, Biochemical studies on ———s. 11, 19, 23, 29, 181, 185, 193, 199, 423, 439, 451.
- Carbohydrate grouping of the mucin from the vitreous humor. 193.
- Choleic acid, Isolation of ——— from dog bile. 55.

- Cholesterol, The simultaneous micro determination of various fractions of lipids (phospholipid, — and fat), together with the determination of their iodine numbers. 401.
- Cholsäure, Über die Isodioxycholsäure. Notiz über die Spezifität der Hammarstensen Reaktion der —. 239.
- Corneamucoid, Prosthetic group of —. 185.

D

- Dehydrocholic acid, Determination of — —. 61.
- Determination, An alkali-titrating method for the — of tissue esterase action and the results obtained by this method. 291.
- Determination, The simultaneous micro determination of various fractions of lipids (phospholipid, cholesterol and fat), together with the — of their iodine number. 401.
- Diabetic, Estimation of free amino-sugar in urines, normal and —. 199.
- 3,6-Diketoallocholansäure, Über das Schicksal der — — — und der β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure im Krötenorganismus. 377.
- Dog, Isolation of cholic acid from — bile. 55.
- Dog, The acetaldehyde formation in the liver of — — — nourished by a normal mixed diet. 251.

E

- Eisen, Das Verhältnis von Kupfer und — im Pflanzengewebe. 45.
- Eisen, Die ontogenetische Untersuch-

- ung von Kupfer und — im Blut der Hühnerembryonen. 33.
- Eiweissfettdiät, Über den Einfluss der — auf die Hippursäuresynthese. 159.
- Element, Die verschiedenen aufbauen- den und katalytischen — e und deren biologische Bedeutung während des Wachstums. 303.
- Embryochemie, Beiträge zur — der Schlangen. 125.
- Ereptic activities, The relationship between oxidoreduction and tryptic and — —. 225.
- Esterase, An alkali-titrating method for the determination of tissue — action and the results obtained by this method. 291.
- Extraktivstoff, Über die N-haltigen — e, besonders die organischen Basen der Bauchspeicheldrüse. 141.
- Extraktivstoff, Über die N-haltigen — e der Schlangemuskeln. 479.

F

- Fat, The simultaneous micro determination of various fractions of lipids (phospholipid, cholesterol and —), together with the determination of their iodine numbers. 401.
- Formaldehyd, Über die kolorimetrische Mikrobestimmung des — s. 385.
- Fugu, On the chemical study of — (Spheroides) poison. 235.
- FUJIMI, Kinsei, Ryoji ITOH and Shin-kichi KAYASHIMA. Studies on lipase. VI. Effects of reduction and oxidation on the splitting action of serum-lipase and milk-esterase. 283.
- FUJITA, Hiroshi. Über die Mikro-

bestimmung der Blutphosphatase. 69.

FUKUDA, Shinogu. Beiträge zur Embryochemie der Schlangen. 125.

FUKUDA, Shinogu. Eine qualitative und quantitative Bestimmung der Pikrolonsäure. 465.

FUKUDA, Shinogu. Über die chemischen Bestandteile des Schnecken-eies. 135.

FUKUDA, Shinogu. Über die Drehungssteigerung der d-Milchsäure. 473.

FUKUDA, Shinogu. Über die N-haltigen Extraktivstoffe, besonders die organischen Basen der Bauchspeicheldrüse. 141.

G

Gallensäure, Über die — von Schildkrötengalle; Trioxysterchoholsäurelaktone. 247.

Geschlechtlichen Unterschied, Über das Kupfer im Organismus beobachtet vom Standpunkt seines phylogenetischen, ontogenetischen und — — — aus. 33, 45.

Gewebe, Über den Gehalt der — an hochgesättigten Kephalin bei der C-Avitaminose. 155.

Glucosamine as a glycogenetic substance in organisms. 423.

Glucosamine, Hyperglycemia after — injection and the mechanism of its occurrence. 439.

Glycogen, Studies on the behaviours of — and lipids under various nutritional states. 351.

Glycogenetic substance, Glucosamine as a — — — in organisms. 423.

H

Hammarstensen Reaktion, Über die Isodioxycholsäure. Notiz über

die Spezifität der — — — der Cholsäure. 239.

HARA, Takiwo. Über den Einfluss der Eiweissfettdiät auf die Hippursäuresynthese. 159.

Hexokinase, On the mechanism of the action of —. 217.

Hippursäuresynthese, Über den Einfluss der Eiweissfettdiät auf die —. 159.

Histidin, Eine Mikrobestimmungsmethode des — — — s. 205.

Hühnerembryo, Die ontogenetische Untersuchung von Kupfer und Eisen im Blut der — — — — —. 33.

Hydrolyse, Die fermentative — — — der p-Nitrophenol-glukoside. 89.

Hyperglycemia after glucosamine injection and the mechanism of its occurrence. 439.

I

IMAMURA, Hiroyuki. Chemie der Schlangen. I. Über die N-haltigen Extraktivstoffe der Schlangengemuskeln. 479.

Iodine, The simultaneous micro determination of various fractions of lipids (phospholipid, cholesterol and fat), together with the determination of their — — — number. 401.

IRI, Sadaya. On the mechanism of the action of hexokinase. 217.

ISAKA, Hideo und Shigeki MIYAZI. Über α - u. β -3-keto-7-Oxycholsäure. 297.

ISEKI, Toshinori und Tsukouru SUGIURA. Zur Kenntnis des Zucker-Aminosäure-Verbindungen. 119.

ISEKI, Toshinori und Tsukouru SUGIURA. Synthese eines hochmolekularen Oxymethylfurfurollderivates. 113.

- Isodioxycholensäure, Über die ——. Notiz über die Spezifität der Hammarstensen'schen Reaktion der Cholsäure. 239.
- Isoserin, Über die Stereoisomerie des ——. s. 107.
- ITO, Takaaki and Junji NAGAI. On the chemical study of fugu (Spheroides) poison. I. Nitrogen distribution in the purified poison. 235.
- ITOH, Ryoji and Fujio OBO. Effects of reduction and oxidation on yeast-saccharase action. 277.
- ITOH, Ryoji and Shinkichi KAYASHIMA. Studies on lipase. VII. An alkali-titrating method for the determination of tissue esterase action and the results obtained by this method. 291.
- ITOH, Ryoji, Shinkichi KAYASHIMA and Kinsei FUJIMI. Studies on lipase. VI. Effects of reduction and oxidation on the splitting action of serum-lipase and milk-esterase. 283.
- K**
- KAIJU, Masaru. Über die Leberarginase. II. Mitteilung. Über die Arginasewirkung bei der Leberautolyse. 265.
- III. Mitteilung. Über die Arginasewirkung auf Acetyl l-phenylalanyl-d-arginin. 271.
- KAMEGAI, Satoru. Über das Kupfer im Organismus, beobachtet vom Standpunkt seines phylogenetischen, ontogenetischen und geschlechtlichen Unterschiede aus. III. Mitteilung: Die ontogenetische Untersuchung von Kupfer und Eisen im Blut der Hühnerembryonen. 33.
- IV. Mitteilung: Das Verhältnis von Kupfer und Eisen im Pflanzengewebe. 45.
- KAYASHIMA, Shinkichi and Ryoji ITOH. Studies on lipase. VII. An alkali-titrating method for the determination of tissue esterase action and the results obtained by this method. 291.
- KAYASHIMA, Shinkichi, Ryoji ITOH and Kinsei FUJIMA. Studies on lipase. VI. Effects of reduction and oxidation on the splitting action of serum-lipase and milk-esterase. 283.
- Kephalin, Über das — bei der Blutgerinnung. 147.
- Kephalin, Über den Gehalt der Gewebe an hochungesättigten — bei der C-Avitaminose. 155.
- α - u. β -3-Keto-7-Oxycholensäure, über — — —. 297.
- KIM, Chai Heung. Über die Gallensäure von Schildkrötengalle; Trioxysterolcholsäurelaktone. 247.
- KIM, Chai Heung, Kazumi YAMASAKI und Kumao TAKAHASHI. Über die Isodioxycholensäure. Notiz über die Spezifität der Hammarstensen'schen Reaktion der Cholsäure. 239.
- KOBAYASHI, Tadasu. Biochemical studies on carbohydrates. LV. Urine mucoid. 451.
- Krötenorganismus, Über das Schicksal der 3,6-Diketoallocholensäure und der β -3-Oxy-6-keto-allocholensäure im ——. 377.
- Kupfer, Das Verhältnis von — und Eisen im Pflanzengewebe. 45.
- Kupfer, Die ontogenetische Untersuchung von — und Eisen im Blut der Hühnerembryonen. 33.
- Kupfer, Über das — im Organismus, beobachtet vom Standpunkt

seines phylogenetischen, ontogenetischen und geschlechtlichen Unterschieds aus. 33, 45.

Kupfer, Über die kolorimetrische Mikrobestimmung des —s. 395.

KURIHARA, Zenya. Eine Mikrobestimmungsmethode des Histidins. 205.

L

Leberarginase, Über die —. 265, 271.

Leberautolyse, Über die Agrinase-wirkung bei der —. 265.

Lipase, Studies on —. 283, 291.

Lipid, Studies on the behaviours of glycogen and —s under various nutritional states. 351.

Lipid, The simultaneous micro determination of various fractions of —s (phospholipid, cholesterol and fat), together with the determination of their iodine numbers. 401.

Liver, On the influence of various kinds of nutrition upon the acetaldehyde formation in the —. 251.

Liver, The acetaldehyde formation in the — of dog nourished by a normal mixed diet. 251.

M

MATSUKAWA, Danji. Über die kolorimetrische Mikrobestimmung des Formaldehyds. 385.

MATSUKAWA, Danji und Isamu NUMATA. Über die kolorimetrische Mikrobestimmung des Kupfers. 395.

MICHIMOTO, Hidetane. Über das Kephalin bei der Blutgerinnung. 147.

MICHIMOTO, Hidetane und Yuji SUEYOSHI. Über den Gehalt der

Gewebe an hochungesättigten Kephalin bei der C-Avitaminose. 155.

Micro determination, The simultaneous — of various fractions of lipids (phospholipid, cholesterol and fat), together with the determination of their iodine numbers. 401.

Mikrobestimmung. Über die kolorimetrische — des Formaldehyds. 385.

Mikrobestimmung, Über die kolorimetrische — des Kupfers. 395.

Mikrobestimmungsmethod, Eine — des Histidins. 205.

d-Milchsäure, Über die Drehungssteigerung der —. 473.

Milk-esterase, Effects of reduction and oxidation on the splitting action of serum-lipase and —. 283.

Mixed diet, The acetaldehyde formation in the liver of dog nourished by a normal —. 251.

MIYAZI, Shigeki und Hideo ISAKA. Über α - u. β -3-keto-7-Oxycholan-säure. 297.

Mucin, Carbohydrate grouping of the — from the vitreous humor. 193.

Mucin from umbilical cord. 19.

Mucin, Submaxillary — and mucoid. 181.

Mucoid, Submaxillary mucin and —. 181.

Mucoid, Urine —. 451.

N

NAGAI, Junji. The relationship between oxidoreduction and tryptic and ereptic activities. 225.

NAGAI, Junji und Takaaki ITO. On the chemical study of fugu

- (Spheroides) poison. I. Nitrogen distribution in the purified poison. 235.
- Nitrogen distribution in the purified poison. 235.
- p-Nitrophenol-glukosid, Die fermentative Hydrolyse der - - - - -e. 89.
- NUMATA, Isamu und Danji MATSUKAWA. Über die kolorimetrische Mikrobestimmung des Kupfers. 395.
- Nutrition, On the influence of various kinds of — upon the acetaldehyde formation in the liver. 251.
- Nutritional state, Studies on the behaviours of glycogen and lipids under various — —s. 351.
- O**
- OBO, Fujio and Ryoji ITOH. Effects of reduction and oxidation on yeast-saccharase action. 277.
- OHNO, Korenori. Studies on the behaviours of glycogen and lipids under various nutritional states. 351.
- OHNO, Korenori and Morio YASUDA. The simultaneous micro determination of various fractions of lipids (phospholipid, cholesterol and fat), together with the determination of their iodine numbers. 401.
- Ontogenetische Untersuchung, Die — — von Kupfer und Eisen im Blut der Hühnerembryonen. 33.
- Organisms, Glucosamine as a glyco-genetic substance in —. 423.
- Organismus, Über das Kupfer im —, beobachtet vom Standpunkt seines phylogenetischen, ontogenetischen und geschlechtlichen Unterschieds aus. 33, 45.
- Oxidation, Effects of reduction and — on the splitting action of serum-lipase and milk-esterase. 283.
- Oxidation, Effects of reduction and — on yeastsaccharase action. 277.
- Oxidoreduction, The relationship between — and tryptic and ereptic activities. 225.
- β -3-Oxy-6-ketoallocholsäure, Über das Schicksal der 3,6-Diketoallocholsäure und der — - — - — im Krötenorganismus. 377.
- Oxymethylfurfurol-derivat, Synthese eines hochmolekularen —es. 113.
- P**
- Pflanzengewebe, Das Verhältnis von Kupfer und Eisen im —. 45.
- l-Phenylalanyl-d-arginin, Über die Arginasewirkung auf Acetyl - - — - —. 271.
- Phospholipid, The simultaneous micro determination of various fractions of lipids (—, cholesterol and fat), together with the determination of their iodine numbers. 401.
- Photoreducing substance, A — — — contained in the commercial candiolin. 459.
- Pikrolonsäure, Eine qualitative und quantitative Bestimmung der Pikrolonsäure. 465.
- Poison, On the chemical study of Fugu (Spheroides) —. 235.
- Polysaccharides from umbilical cord. 23.
- R**
- Reduction, Effects of — and oxidation on the splitting action of serum-lipase and milk-esterase.

283.

Reduction, Effects of — and oxidation on yeastsaccharase action. 277.

Ri, Kokusho. On the influence of various kinds of untrition upon the acetaldehyde formation in the liver. Report 1. The acetaldehyde formation in the liver of dog nourished by a normal mixed diet. 251.

S

SABA, George. Determination of dehydrocholic acid. 61.

SABA, George. Isolation of choleic acid from dog bile. 55.

Schildkrötengalle, Über die Gallensäure von —; Trioxysterolcholansäurelaktone. 247.

Schlange, Beiträge zur Embryochemie der —n. 125.

Schlange, Chemie der. —n. 479.

Schlangemuskel, Über die N-haltigen Extraktivstoffe der —n. 479.

Schneckenkei, Über die chemischen Bestandteile des —es. 135.

Seidenspinner, Beiträge zur Wachstumphänomen des —s. (I). 303.

SEIKI, Yoshinori. Über die Stereoisomerie des Isoserins. 107.

SEIKI, Yoshinori und Masaji TOMITA. Über die Stereoisomerie der γ -Amino- β -oxy-buttersäure. 101.

Serum-lipase, Effects of reduction and oxidation on the splitting action of — and milk-esterase. 283.

Sheep, The chemical nature of an aqueous extract of the suprarenal cortex of —. 1.

Stereoisomerie, Über die — der γ -Amino- β -oxy-buttersäure. 101.

Stereoisomerie, Über die — des Isoserins. 107.

"Sublingual mucoid" and an artificial saliva mucin. 11.

Submaxillary mucin and mucoid. 181.

SUEYOSHI, Yuji und Hidetane MICHIMOTO. Über den Gehalt der Gewebe an hochungesättigten Kephalin bei der C-Avitaminose. 155.

SUGIURA, Tsukouru und Toshinori ISEKI. Synthese eines hochmolekularen Oxymethylfurfurolderivates. 113.

SUGIURA, Tsukouru und Toshinori ISEKI. Zur Kenntnis der Zucker-Aminosäure-Verbindungen. 119.

Suprarenal cortex, The chemical nature of an aqueous extract of the — of sheep. 1.

SUZUKI, Masami. Biochemical studies on carbohydrates. XLVI. Mucin from umbilical cord. 19.

XLVII. Polysaccharides from umbilical cord. 23.

L. Prosthetic group of cornea-mucoid. 185.

LI. Carbohydrate grouping of the mucin from the vitreous humor. 193.

T

TAKAHASHI, Kumao, Kazumi YAMASAKI und Cha Heung KIM. Über die Isodioxycholensäure. Notiz über die Spezifität der Hammarstenschen Reaktion der Cholsäure. 239.

TANABE, Yasuhisa. Biochemical studies on carbohydrates. XLV. "Sublingual mucoid" and an artificial saliva mucin. 11.

XLIX. Submaxillary mucin and mucoid. 181.

TAWARA, Motomasa. A photoreducing substance contained in the commercial candiolin. 459.

TOMITA, Masaji and Yoshinori SEIKI. Über die Stereoisomerie der γ -Amino- β -oxy-buttersäure. 101.
 Trioxysterocolansäurelaktone. Über die Gallensäure von Schildkröten-galle; ——. 247.

Tryptic activities, The relationship between oxidoreduction and — and ereptic activities. 225.

TUKAMOTO, Morihisa. Über das Schicksal der 3,6-Diketoallocholansäure und der β -3-Oxy-6-keto-allocholansäure im Krötenorganismus. 377.

U

Umbilical cord, Mucin from ——. 19.

Umbilical cord, Polysaccharides from ——. 23.

Urine, Estimation of free aminosugar in —s, normal and diabetic. 199.

Urine mucoid. 451.

V

Vitreous humor, Carbohydrate grouping of the mucin from the ——. 193.

W

Wachstum, Die verschiedenen aufbauenden und katalytischen Elemente und deren biologische Bedeutung während des —s. 303.

Wachstumphänomen, Beiträge zur — des Seidenspinners (I). 303.

Y

YAMASAKI, Kazumi, Kumao TAKAHASHI und Chai Heung KIM. Über die Isodioxycholensäure. Notiz über die Spezifität der Hammarstenschens Reaktion der Cholsäure. 239.

YASUDA, Morio and Korenori OHNO. The simultaneous micro determination of various fractions of lipids (phospholipid, cholesterol and fat), together with the determination of their iodine numbers. 401.

Yeastsaccharase, Effects of reduction and oxidation on — action. 277.

YOSITAKE, Masato. Biochemical studies on carbohydrates.

XLVIII. An estimation of free bloodsugar in the co-presence of aminosugar. 29.

LLI. Estimation of free aminosugar in urines, normal and diabetic. 199.

YOSITAKE, Masato. Biochemical studies on carbohydrates.

LIII. Glucosamine as a glycogenetic substance in organisms. 423.

LIV. Hyperglycemia after glucosamine injection and the mechanism of its occurrence. 439.

Z

Zucker-Aminosäure-Verbindung, Zur Kenntnis der ————en. 119.

